

Maija Joensuu & Maija Hanhela

NAV3-GEENIMERKKIAINEMENETELMÄN KEHITTÄMISPROJEKTI

NAV3-GEENIMERKKIAINEMENETELMÄN KEHITTÄMISPROJEKTI

Maija Hanhela & Maija Joensuu

Opinnäytetyö

Kevät 2015

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijät: Maija Joensuu, Maija Hanhela
Opinnäytetyön nimi: NAV3-geenimerkkiainemenetelmän kehittämisprojekti
Työn ohjaajat: Simo Rasi, Paula Reponen, Jani Salmivaara
Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2015
Sivumäärä: 46 + 10 liitesivua

Syöpä on hyvin yleinen geneettinen sairaus, johon sairastuu noin joka kolmas suomalainen elinikänsä aikana. NAV3-geeni on syöpään yhdistetty merkkiainegeeni, joka sijaitsee kromosomissa 12. Geenin toistojaksomutaatioita on löydetty lukuisista eri syöpätyypeistä ja mutaation laadulla on todettu olevan yhteys myös tiettyjen syöpien ennusteeseen. Toistojaksomutaatioita voidaan tutkia soluista fluoresenssi *in situ* hybridisaatiolla, jossa tutkittavalle geenille komplementaariset fluoresoivalla merkkiaineella leimatut koettimet sitoutuvat näytteeseen eri tavalla riippuen kromosomissa olevien toistojaksojen määrästä. Sitoutuneen koettimen lähettämä fluoresenssisignaali voidaan havaita fluoresenssimikroskoopilla.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää NAV3-geenimerkkiainemenetelmää ValiFinnin ja Oulun ammattikorkeakoulun laboratoriotiloissa siten, että menetelmästä saataisiin kyseisissä tiloissa toimiva ja laadukas kokonaisuus, jota voidaan käyttää laboratoriossa rutiinisti. Menetelmä testattiin toistamalla se ohjeiden mukaan useaan kertaan. Koettimien toimivuus tarkistettiin lopuksi fluoresenssimikroskoopilla. Menetelmätyöohjeet olivat valmiiksi standardoidut, mutta niitä jouduttiin muokkaamaan uusiin tiloihin ja laitteistoihin sopiviksi. Menetelmiin kuului laitteiston, näytteiden ja reagenssien kartoitus ja tilaaminen, liuosten valmistaminen, bakteerien kasvattaminen, DNA:n eristäminen, alukkeiden suunnittelu ja tilaaminen, koettimien ja näyttemateriaalin valmistus, fluoresenssi *in situ* hybridisaatio ja hybridisaation analysointi fluoresenssimikroskoopilla.

Näytteet ja liuokset saatiin valmistettua menetelmätyöohjeiden mukaisesti, mutta itse fluoresenssi *in situ* hybridisaatio saatiin toimimaan vain osittain. Hybridisaatio ei ollut tarpeeksi spesifi ja sitoutuneista koettimista saadut signaalit olivat suhteellisen heikkoja. Tulokset olivat kuitenkin lupaavia, sillä koettimia optimoimalla hybridisaatio saadaan todennäköisesti jatkossa toimimaan. Kehitystyötä voidaan jatkaa esimerkiksi tehostamalla DNA-eristystä sekä muuntelemalla koettimien teko-olosuhteita.

Asiasanat: Neuroninavigaattorigeeni 3, NAV3, fluoresenssi *in situ* hybridisaatio, syöpämerkkiaine

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree programme in Biomedical Laboratory Science

Authors: Maija Joensuu, Maija Hanhela
Title of thesis: Development project of NAV3 marker gene method
Supervisors: Simo Rasi, Paula Reponen, Jani Salmivaara
Term and year when the thesis was submitted: Spring 2015
Number of pages: 46 + 10 appendices

Cancer is a very common genetic disease and one in three Finn will get the disease during their lifetime. NAV3-gene is a new marker gene located in chromosome 12 associated with cancer. NAV3 copy number variations have been associated with multiple different cancer types and quality of the mutation has also been linked with the prognosis of the disease. Copy number variations can be detected using fluorescence *in situ* hybridization which is based on complementary fluorescent probes that bind to the sample differently depending on the copy number variation. The fluorescence signal from the probe can be detected using a fluorescence microscope.

Purpose of this thesis was to develop the NAV3 marker gene method in Valifinn and OAMK laboratory facilities to gain a functional and good quality method that can be used routinely in the laboratory. The method was tested by repeating it multiple times. The probes were tested in the end using a fluorescence microscope. The laboratory procedure manuals were standardized but they were slightly altered to fit the equipment and laboratory facilities we used. The method included survey and ordering of laboratory equipment, reagents and samples, growing bacteria, isolating DNA, planning and ordering primers, preparing probes and samples, fluorescence *in situ* hybridization and analyzing the samples.

The samples and solutions were prepared successfully according to the laboratory procedure manuals but the fluorescence *in situ* hybridization was only partially successful. The hybridization was not specific enough and the fluorescence signal seen in the fluorescence microscope was relatively weak. However the results were promising and it's likely that the method will be successfully optimized in the near future. The development work can be continued by enhancing the DNA-isolation and altering the procedure conditions while preparing the fluorescence probes.

Keywords: Neuron navigator gene 3, NAV3, fluorescence *in situ* hybridization, cancer marker gene

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	6
2 FLUORESENSSI <i>IN SITU</i> HYBRIDISAATIO	8
3 NEURONINAVIGAATTORIGEENI 3 (NAV3)	10
3.1 NAV3 ja syöpä	10
4 OPINNÄYTETYÖN SUUNNITTELUPROSESSI JA TAVOITTEET	12
5 MENETELMÄT	13
5.1 Tilojen, reagenssien ja laitteiston kartoitus sekä liuosten valmistaminen	14
5.2 BAC-vektorin sisältävien bakteerien kasvatus, alukkeiden suunnittelu ja PCR	15
5.3 BAC (bacterial artificial chromosome)-DNA:n eristys	18
5.4 CEN-plasmidin transformointi <i>E. coliin</i> , bakteerin kasvatus ja plasmidi-DNA:n eristys	18
5.5 Näyttemateriaali ja näytepreparaattien valmistaminen	21
5.5.1 Tumaeristys ja tumalasiin valmistaminen	21
5.5.2 Syöpäsolukasvatuksista valmistettujen näytteiden valmistaminen	22
5.5.3 Metafaasilasiin valmistaminen	23
5.6 DNA:n leimaus ja koettimien saostus	24
5.7 Näytteiden esikäsittely	28
5.8 FISH-hybridisaatio ja post-hybridisaatiopesut	28
5.9 Näytteiden analysointi fluoresenssimikroskoopilla	29
6 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET	31
6.1 BAC-vektorin sisältävien bakteerien kasvatus ja PCR	31
6.2 CEN-plasmidin transformointi <i>E. coliin</i> , bakteerin kasvatus ja plasmidi-DNA:n eristys	33
6.3 DNA:n leimaus ja koettimien saostus	33
6.4 Näytteiden valmistaminen	35
6.4.1 Tumaeristys ja tumalasiin valmistaminen	35
6.4.2 Metafaasilasiin valmistaminen	36
6.5 Hybridisaatio ja näytteiden analysointi mikroskoopilla	37
7 POHDINTA	41
8 LÄHTEET	44
9 LIITTEET	47

1 JOHDANTO

Syöpä on yleinen sairaus, sillä noin joka kolmas suomalainen sairastuu elinikänsä aikana johonkin syöpään. On siis tavallista, että suvussa on joitain syöpään sairastuneita henkilöitä, mutta vaikka syöpä on geneettinen (tai epigeneettinen) sairaus, harva syöpä on perinnöllinen. Yleensä syövälle altistavia mutaatioita löytyy ainoastaan somaattisista soluista eikä sukusoluista, jolloin alttius periytyisi suoraan jälkeläisen jokaiseen soluun. Perimän lisäksi syövän syntymiseen vaikuttavat aina myös ympäristötekijät ja yksi mutaatio DNA:ssa ei riitä muuttamaan normaalia solua syöpäsoluksi. (Alberts ym. 2002 & Pukkala ym. 2011.)

Syöpäsoluksi määritellään solu, joka alkaa jakautua epänormaalisti ja leviää alueille, joissa on normaalisti muita soluja. Yhteen pakkautuneita ja paikallaan epänormaalisti jakautuvia solurykelmiä kutsutaan benigneiksi eli hyvänlaatuisiksi kasvaimiksi. Kun solut alkavat tunkeutua ympäröivään kudokseen, kasvain muuttuu maligniksi eli pahanlaatuiseksi syöväksi. Pahanlaatuinen syöpä voi levitä verenkierron mukana myös kauas alkuperäisestä syntykudoksesta muodostaen etäpesäkkeitä eli metastaaseja. Syövät luokitellaan sen kudoksen tai solutyypin mukaan, josta se on lähtöisin. Epiteelisoluista peräisin olevia syöpiä kutsutaan karsinoomiksi, tukikudoksesta peräisin olevia syöpiä sarkoomiksi ja luuytimen verisoluista peräisin olevia syöpiä leukemioiksi. (Alberts ym. 2002.)

Monet tekijät voivat aiheuttaa syöpää, mutta yleisimmät karsinogeenit eli syöpää aiheuttavat mutageenit ovat kemiallisia mutageeneja, viruksia tai ionisoivaa säteilyä. Myös ympäristötekijöillä on merkittävä vaikutus syövän syntyyn ja esimerkiksi ravintotekijät voivat selittää osin jopa noin kolmanneksen syöpätapauksista (Williams ym. 2005). Yleisimmin karsinogeenit kohdistuvat DNA:han aiheuttaen mutaatioita sen rakenteisiin. Sattuman vaikutuksesta mutaatiot voivat kohdistua myös syövän kehittymisen kannalta kriittisiin geeneihin. Iän myötä näitä mutaatioita kertyy soluihin yhä enemmän, joten syöpäriski kasvaa iän mukana. Syövän kehittymiselle kriittiset geenit voidaan jakaa karkeasti kahteen osaan: onkogeeneihin ja tuumorisuppressorigeeneihin. Onkogeenit vaikuttavat aktivoivien mutaatioiden myötä suoraan kiihdyttävästi solun jakaantumiseen ja tuumorisuppressorigeenit eivät enää inaktivoivien mutaatioiden myötä kykene hillitsemään solun jakautumista, jolloin solu alkaa jakaantua hallitsemattomasti. (Alberts ym. 2002)

Syövän synnyn kannalta kriittisiä geenejä etsitään jatkuvasti, jotta syövän diagnosointia ja hoitoa voitaisiin kehittää. Tahti on vain kiihtynyt sekvensointimenetelmien ja muiden molekyylibiologisten menetelmien kehityttyä ja ihmisen genomien sekvensoinnin myötä. Eri geenien yhdistelmät toimivat kuitenkin hyvin monimutkaisella tavalla ja kasvava tieto syöpäalttiiden geenien mutaatioista, sekvensseistä ja eksperessioista muodostaa monimutkaisen ja haastavan kartan, jossa jokaisella palapelin osalla on merkityksensä. (Alberts ym. 2002.)

NAV3 on uusi syövän merkkigeeni, jonka kopiolumuutosmutaatiot kromosomeissa on yhdistetty lukuisiin yleisiin syöpätyyppeihin. Tämän projektin tarkoituksena on kehittää fluoresenssi *in situ* hybridisaatioon perustuvaa NAV3-syöpämerkkiainegeenitestiä Valifinnin ja Oulun ammattikorkeakoulun laboratoriotiloihin soveltuvaksi laadukkaaksi menetelmäksi. Geenitestillä uskotaan olevan diagnostista hyötyä tapauksissa, joissa morfologisia syöpämuutoksia ei ole vielä syntynyt ja siten koepalan mikroskopointiin perustuva analysointi on haastavaa. NAV3-kopiolumuutokset ovat myös tutkimusten mukaan indikoineet huonompaa ennustetta tietyissä syövyissä (Carlsson ym. 2013).

2 FLUORESENSSI *IN SITU* HYBRIDISAATIO

Nukleiinihappojen hybridisaatiossa eri lähteistä peräisin olevat yksinauhaiset, toisilleen komplementaariset juosteet liittyvät toisiinsa eli hybridisoituvat. Hybridi voi koostua kahdesta DNA-molekyylistä, kahdesta RNA-molekyylistä tai yhdestä DNA- ja yhdestä RNA-molekyylistä. Toinen hybridisoituvista nauhoista voidaan leimata jollakin merkkiaineella, jolloin hybridi voidaan havaita leiman tuottaman signaalin perusteella. Leimattua DNA- tai RNA-jaksoa kutsutaan koettimeksi. (Klug ym. 2009.)

Fluoresenssi *in situ* hybridisaatio eli FISH on yksi nukleiinihappohybridisaation sovelluksista, jossa yhdistyy molekyyli-genetiikan ja perinteisen kromosomitutkimuksen piirteitä. *In situ* hybridisaatiossa käytetään leimattuja DNA-koettimia paikallistamaan spesifisiä DNA-alueita kudoksenleikkeessä. Koetin hybridisoidaan suoraan histologiseen preparaattiin eli DNA:ta tai RNA:ta ei eristetä näytteestä. FISH-hybridisaatiossa koettimien leimauksessa käytetään fluoresoivia merkkiaineita eli fluorokromeja, jolloin hybridisaatiota voidaan havainnoida fluoresenssimikroskoopilla. (Wilkinson 1998.)

FISH-menetelmästä on olemassa monenlaisia sovelluksia. Koko kromosomin leimaamisessa yksi kokonainen kromosomi värjäytyy. Subtelomeeri-FISH-sovelluksella pystytään tutkimaan kromosomin telomeerialueita, kun kromosomien kärkialueet on leimattu (Knuuttila 2006). Lokusspesifisessä FISH-tutkimuksessa pyritään tunnistamaan hyvin pieniä alueita, jopa vain yhden geenin mittaisia pätkiä. FISH-analyysillä voidaan myös selvittää tutkittavan lokuksen tai geenin merkitystä kohdegenomissa. Geenin tai lokuksen kopiolukua tarkastelemalla voidaan havaita amplifikaatioita (kopioluku suurempi kuin normaali) ja deleetiot (kopioluku pienempi kuin normaali). FISH-menetelmällä voidaan osoittaa myös translokaatio eli geenin siirtyminen uuteen paikkaan genomissa. FISH-tutkimusta voidaan käyttää erilaisten tautitilojen selvittelyyn ja seurantaan. Yleisimmin käytettyjä kohteita ovat sikiön mahdolliset kehityshäiriöt, pahanlaatuisten veritautien ja muiden syöpien diagnostiikka sekä seuranta. (Bayani & Squire 2008, 247.)

FISH-hybridisaatio prosessissa on monta vaihetta. Ensimmäiseksi kudoksenleike kiinnitetään objektilasille ja kudoksenleikkeelle voidaan tehdä proteinaasi K -entsyymikäsittely, jonka seurauksena koetin pääsee helpommin solujen sisään. Tämän jälkeen kudoksenleike denaturoidaan, jotta näyttemateriaalin kaksoiskierteinen DNA saadaan avattua yksijuosteiseksi. Myös leimattu DNA-koetin dena-

turoidaan samanaikaisesti. Tämän jälkeen tapahtuu varsinainen hybridisaatio, kun denaturoitu koetin lisätään objektilasille näytemateriaalin päälle. Hybridisaation annetaan tavallisesti kestää ainakin 24 tuntia, jonka jälkeen ylimääräiset hybridisoitumattomat koetinmolekyylit pestään pois. (Tönnies 2002.)

Hybridisaatio-olosuhteet optimoidaan siten, että koetin sitoutuisi mahdollisimman tehokkaasti ja spesifisesti. Hybridisoitumiseen vaikuttavat mm. lämpötila, hybridisaatiopuskurin suolapitoisuus, tutkittavan alueen ja koettimen pituus, sekä näiden G+C-pitoisuus. Hybridisaation jälkeisten pesujen lämpötilaa ja suolapitoisuutta säätämällä voidaan vaikuttaa pesujen tehokkuuteen ja näin hybridisaation lopputulokseen. (Suominen ym. 2010.)

3 NEURONINAVIGAATTORIGEENI 3 (NAV3)

Neuroninavigaattorigeeni 3 (NAV3) kuuluu konservoituneeseen geeniperheeseen, johon kuuluu kolme navigaattorigeenia: NAV1, NAV2 ja NAV3. Geenien välillä on paljon homologiaa eli samansyntyistä samankaltaisuutta ja geeneille löytyy homologeja myös muilta lajeilta. Konservoituneiden geenien lajienväliset erot geenien rakenteessa ovat vähäisiä viitaten valintapaineeseen geenimutaatioita vastaan. Konservoituneet geeniperheet ovat yleensä elintärkeitä solun toiminnalle. (Carlsson ym. 2013a.) NAV3-geenin tarkkaa merkitystä solujen toiminnalle ei tunneta, mutta sillä uskotaan olevan tärkeä rooli mikrotubulusten ja solun tukirangan (cytoskeleton) uudelleenjärjestäytymisessä ja se ekspressoituu pääasiassa hermostossa. Hiljattain navigaattorigeeniperheen on ehdotettu kuuluvan mikrotubulusten +-pään jäljitysproteiineihin (+TIP) ja siten osallistuvan useisiin solulle elintärkeisiin prosesseihin, kuten mitoosein. (Carlsson 2012, Martinez-Lopez ym. 2005; NCBI 2015, viitattu 16.1.2015).

3.1 NAV3 ja syöpä

NAV3-geeni on yksi uusista syöpään yhdistetyistä, kliinisen käytön kannalta lupaavista geeneistä, joka sijaitsee kromosomissa 12q21. Syövän synty johtuu DNA:han syntyneistä mutaatioista, jotka johtavat syöpäsolujen poikkeavaan jakautumisen- ja kasvunsäätelyyn. NAV3-geenin toistojaksomutaatioita on havaittu useissa eri syöpätyypeissä kuten ihon t-solulymfoomassa (CTLC) (Karenko ym. 2005), CTCL:ään yhdistetyssä keuhkosyövässä (Hahtola ym. 2008), aivokasvaimissa (glioblastoma multiforme) (Nord ym. 2009) sekä paksusuolen syövässä (Wood ym. 2007, Carlsson ym. 2012b). NAV3:n toistojaksomuutoksia on havaittu myös rintasyövässä (Wood ym. 2007) sekä melanoomassa (Bleeker ym. 2009). NAV3-geenissä esiintyvät toistojaksomutaatiot voivat olla joko amplifikaatioita tai deleetioita ja geenin ekspressio voi myös vähentyä.

NAV3-geenin toistojaksomuutosten yhteyttä syövän ennusteeseen on tutkittu hermojärjestelmän kasvaimissa. Neuronaalisissa kasvaimissa on enemmän NAV3-amplifikaatioita ja gliasolujen kasvaimissa on sekä amplifikaatioita että deleetioita. Gliasolujen kasvaimissa amplifikaatiot ovat sitä harvinaisempia, mitä vähemmän gliooma on erilaistunut, mikä viittaisi siihen, että kopiokumutaatioiden laadulla (amplifikaatio vai deleetio) on yhteys kasvaimen kliiniseen käyttäytymiseen. NAV3-amplifikaatiot hermojärjestelmän kasvaimissa olivat tutkimuksen mukaan yhteydessä pa-

rempaan ennusteeseen ja vastaavasti deleetit huonompaan ennusteeseen. (Carlsson ym. 2012a.)

Tämän projektin tarkoituksena on saada tuotettua fluoresoivilla merkkiaineilla leimatut NAV3-geenispesifiset sekä kromosomi 12 sentromeerialueelle spesifiset koettimet. Koettimet hybridisoidaan näytepreparaattien kanssa. Tämän jälkeen voidaan tarkastella hybridisaation onnistumista fluoresenssimikroskoopilla. Mikäli hybridisaatio onnistuu voidaan tutkittavien preparaattien NAV3-geenin kopiolumäärä laskea ja yrittää verrata onko kopioluku pienempi tai suurempi sairaasta kudoksesta otetuissa näytteissä verrattuna terveeseen kudoksenäytteeseen.

4 OPINNÄYTETYÖN SUUNNITTELUPROSESSI JA TAVOITTEET

Opinnäytetyömme tilaaja oli Oulun ammattikorkeakoulun kanssa yhteistyössä toimiva monikansallinen bioteknologia-alan yritys ValiRx Finland Oy eli ValiFinn. ValiFinnin omistaa Iso-Britanniassa toimiva lääkekehitysyritys ValiRx Plc. Opinnäytetyön ohjaajina ja asiantuntija-apuna toimivat lehtori Paula Reponen sekä sairaalakemisti Simo Rasi ja myöhemmässä vaiheessa laboratorionjohtaja Jani Salmivaara.

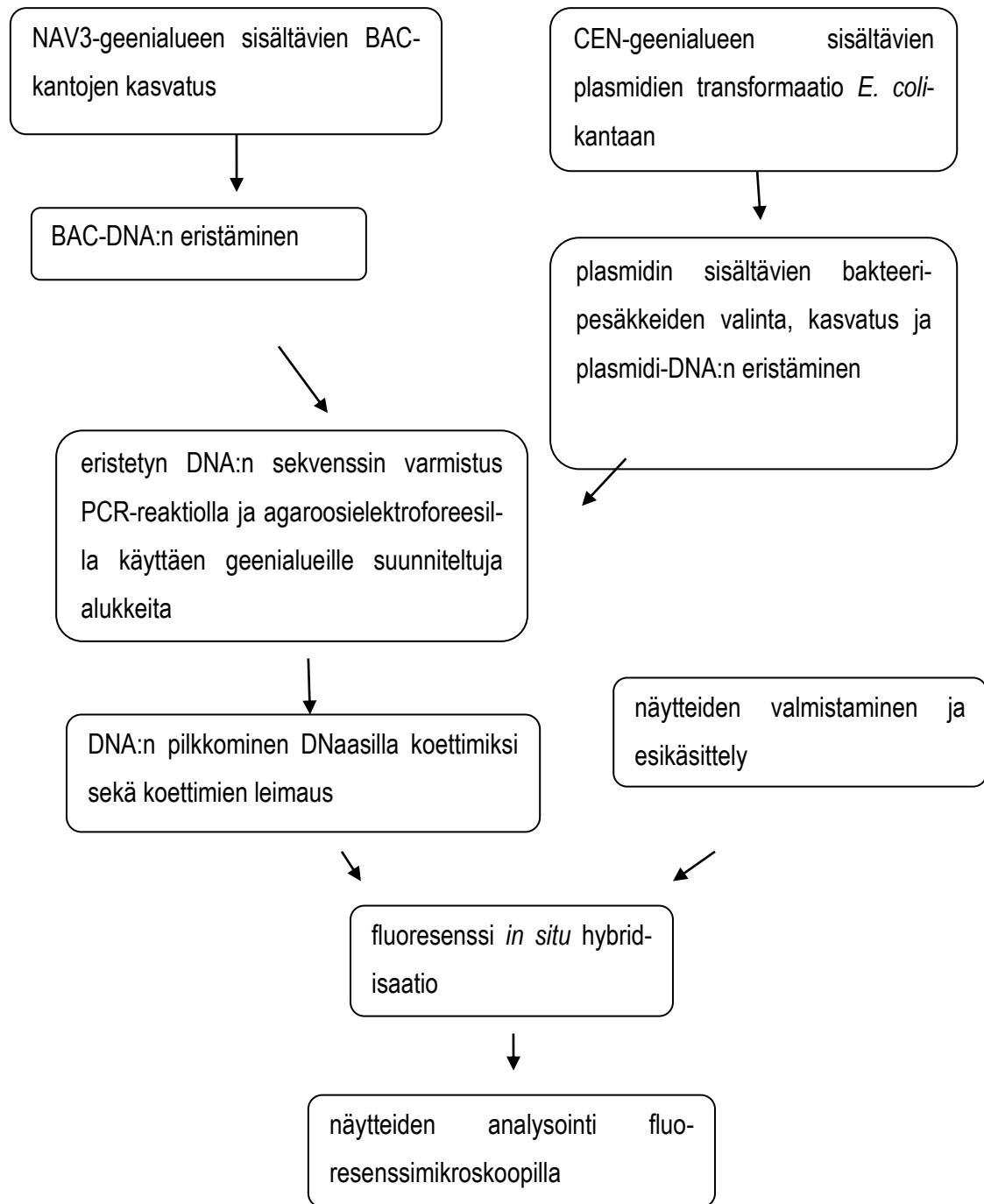
Projektin tavoitteena oli kehittää fluoresenssi *in situ* hybridisaatioon perustuvaa NAV3- syöpämerkkiaimenemenetelmää siten, että se muodostaisi ValiFinnin ja Oulun ammattikorkeakoulun tiloissa toimivan ja laadullisesti luotettavan kokonaisuuden, jota voitaisiin mahdollisuuksien mukaan tarjota tulevaisuudessa palvelutoimintana. Opinnäytetyön tekijöiden tehtävänä projektissa oli suorittaa kaikki käytännön laboratoriotyövaiheet, joita olivat:

- BAC:ien ja CEN12 kasvatus
- DNA:n eristys ja puhdistus
- Sekvenssien tarkistus PCR:llä itse suunniteltujen alukkeiden avulla
- Näyttemateriaalin käsittely ja varastointi sekä kirjanpito
- DNA-koettimien leimaus
- Näytteiden esikäsittely
- Fluoresenssi *in situ* hybridisaatio
- Näytteiden analysointi fluoresenssimikroskoopilla

Opinnäytetyön tekijät kartoittivat myös tarvikkeiden, reagenssien ja laitteiston riittävyyden ja saatavuuden sekä valmistivat työhön tarvittavat liuokset. Laboratoriotyöt tehtiin standardisoitujen työohjeiden mukaisesti (standard operation procedure, SOP), joiden tavoitteena on vakioida ja yhtenäistää menetelmä eri laboratorioissa. SOP:it oli laatinut Marianne Karlsberg, joka on työskennellyt aiemmin Dermagene Oy:ssä, jossa menetelmää on käytetty lääketieteellisessä tutkimustyössä. Opinnäytetyön tekijöiden tavoitteena oli muokata ja optimoida työohjeita Oulun ammattikorkeakoulun tiloihin soveltuviksi, jotta kaikki työvaiheet saatiin suoritettua onnistuneesti ja työn tulokseksi näytteitä, joiden solujen NAV3-geenin kopiolukua pystyi tarkastelemaan fluoresenssimikroskoopilla. Lisäksi opinnäytetyön tekijöiden henkilökohtaisina tavoitteina oli soveltaa teorian tietoa genetiikan ja molekyylibiologian menetelmistä käytäntöön ja oppia projektin- ja laadunhallintaa.

5 MENETELMÄT

NAV3-syöpämerkkiainemenetelmä perustuu fluoresenssi *in situ* hybridisaatioon. NAV3- ja CEN12-geenialueet kopioidaan aluksi kasvattamalla bakteerikantaa, joissa geenialueet ovat liitettyinä joko BAC- (bacterial artificial chromosome) tai plasmidivektorissa. Keinotekoiset kromosomit tai plasmidit eristetään bakteerisoluista ja PCR-menetelmällä (NAV3) tai fluoresenssimikroskopilla (CEN12) varmistetaan, että niissä on oikea insertti. DNA käsitellään DNAasi-entsyymillä, joka pilkkoo nukleiinihapon pieniksi (alle 600 emäsparia) koettimiksi, jotka leimataan fluoresoivalla merkkiaineella. Koettimet hybridisoidaan näytteeseen, jonka jälkeen näytettä voidaan tutkia fluoresenssimikroskopilla ja analysoida kromosomien kopiolukumuutoksia. Menetelmä on esitetty tiivistetysti kuvassa 1.



KUVA 1. NAV3-syöpämerkkiainemenetelmän toimintaperiaate kaaviona.

5.1 Tilojen, reagenssien ja laitteiston kartoitus sekä liuosten valmistaminen

Ennen laboratoriotyöosuuden aloittamista kaikkien työhön tarvittavien laitteiden ja reagenssien saatavuus varmistettiin. Kaikki työohjeet saimme Marianne Karsbergiltä, joka on aiemmin käyttä-

nyt menetelmää tutkimustyössään. Suurimman osan liuoksista teimme itse ja joitakin kaupallisia liuoksia myös tilattiin. Liuoksien tilauksista huolehti pääasiassa Simo Rasi. Liuosten tekoon käytetyt reagenssit saatiin ValiRx:ltä tai koululta. Liuoksista ja tarvikkeista kirjattiin lista, johon merkittiin liosten valmistuspäivämäärä, säilyvyys ja säilytysohjeet.

Laboratoriotöissä noudatimme hyvien laboratoriokäytänteiden ohjeita (GLP, good laboratory practice), pidimme laboratoriopäiväkirjaa ja kiinnitimme erityistä huomiota steriilisyöskentelyyn kontaminaatioiden välttämiseksi. Kaikki tarvikkeet, reagenssit ja liuokset, joita käytettiin kontaminaatioherkissä menetelmissä joko ostettiin steriileinä tai autoklavoitiin ennen käyttöä. Työskentelytilojen pinnat puhdistettiin ennen käyttöä puhdistusaineella ja 70% etanolilla. Soluviljelyvaiheet suoritettiin vain soluviljelyyn tarkoitettussa steriilissä laminaarikaapissa.

5.2 BAC-vektorin sisältävien bakteerien kasvatus, alukkeiden suunnittelu ja PCR

BAC (bacterial artificial chromosome) eli keinotekoinen bakteerikromosomi on kloonauksvektori, joka voi sisältää suuria, jopa miljoona emäsparia sisältäviä DNA-fragmentteja. Vektoreita (mm. BAC, plasmidit) voidaan käyttää geneettisen materiaalin siirtämiseen isäntäsoluun tai organismiin. Kloonauksvektori mahdollistaa DNA-materiaalin kloonauksen eli monistamisen isäntäsolun replikointikoneiston avulla. BAC-vektorit ovat suosittuja mm. kompleksisten organismien DNA-kirjastoissa. (Alberts ym. 2002.)

Tässä menetelmässä NAV3-geenialue on pBACe3.6 vektoreissa (BAC36P3 ja BAC136F16), jotka on transformoitu DH10B *E. coli* -kannan bakteeriin. Bakteerit on tilattu Life Technologiesiltä. Bakteeria voidaan kasvattaa LB-liuosta sisältävissä kasvatusviljelmissä, minkä jälkeen bakteerimassasta voidaan eristää suuria määriä halutun geneettisen fragmentin sisältävää BAC-vektoria. Työvaiheissa tulee noudattaa hyviä steriilisyöskentelyn työtapoja.

Bakteerit maljattiin hajotusviljelmänä LB-maljoille, jotka sisälsivät 12,5 µg/ml kloramfenikolia. BAC-vektori pitää sisällään kloramfenikoli-resistenssigeenin, joka antaa vastustuskyvyn kloramfenikoli-antibioottia kohtaan. Tämän takia ainoastaan bakteerit, joihin vektori on transformoitunut, pystyvät kasvamaan maljoilla. Bakteeriviljelmää kasvatettiin yön yli 37°C:ssa. Seuraavana päivänä yksittäisiä pesäkkeitä kerättiin 6ml:aan LB-liuosta, joka sisälsi kloramfenikolia (12,5 µg/ml). Yksittäisiä pesäkkeitä valitsemalla varmistuttiin siitä, että LB-liuokseen pääsee vain yhdestä bak-

teerista peräisin olevia *E. coli* -klooneja. Bakteeria kasvatettiin LB-liuoksessa, kunnes bakteeripopulaation kasvu oli ns. stationäärifaasissa. Stationäärifaasissa bakteeripopulaation kasvu on saavuttanut maksimiarvonsa ja eksponentiaalinen kasvuvaihe päättyy. Kasvuvaihe varmennettiin mittaamalla bakteerikasvuston absorptio aallonpituudella 600 nm spektrofotometrisesti. Kun OD₆₀₀ (optic density) on välillä 1-2, bakteerikasvusto on stationäärifaasissa.

Jotta varmistuttiin, että kasvatettu bakteeriklooni sisälsi halutun geenialueen sisältävän BAC-vektorin, suoritettiin PCR-reaktio halutulle NAV3-geenialueelle suunnitelluilla alukkeilla. Alukkeet suunniteltiin etsimällä NAV3-geenialueen sekvenssit NCBI:stä (National Center for Biotechnology Information) ja syöttämällä ne FASTA-formaatissa Primer3-ohjelmaan (v.0.4.0) oletusasetuksilla, jolloin PCR-tuotteiden kooksi saatiin n.1000 emäsparia. Alukkeiden suunnittelussa tulee ottaa huomioon useita muuttujia, joita ovat mm. alukkeiden ja monistettavan tuotteen pituus, alukkeiden oikea GC-pitoisuus (40-60%) sekä alukkeiden sopiva sulamislämpötila. Alukkeet eivät myöskään saisi sisältää toistojaksoja eivätkä toisiinsa tai sisäisesti sitoutuvia jaksoja (Tuinala 2005). Nykyiset alukkeiden suunnitteluun käytettävät tietokoneohjelmat ovat erinomaisia työkaluja alukkeiden suunnittelussa, sillä ne ottavat huomioon useita muuttujia ja antavat useita vaihtoehtoja sopiviksi alukkeiksi. Ennen käyttöä on kuitenkin hyvä tarkistaa ohjelman käyttämät asetukset ja myös tarkistaa ehdotettujen alukkeiden sekvenssi ennen tilaamista. Valitut alukkeet tilattiin Oligomeriltä. Ennen käyttöönottoa kuivattuna saapuneet alukkeet liuotettiin alukkeiden mukana tulneiden ohjeiden mukaan steriiliin veteen, jolloin alukkeiden varastoliuoksen konsentraatioksi saatiin 100 µM.

Polymeraasiketjureaktiossa (PCR, polymerase chain reaction) haluttua DNA-aluetta monistetaan eksponentiaalisesti polymeraasientsyymin avulla PCR-laitteessa. Polymeraasiketjureaktio koostuu denaturaatio-, alukkeiden liittymis- ja pidentymisvaiheesta. Denaturaatiovaiheessa DNA:n vastinjuosteet eroavat toisistaan korkean lämpötilan (92°C) vuoksi. Alukkeet liittyvät yksijuosteisiin DNA-rihmoihin, kun lämpötilaa lasketaan alukkeiden sulamislämpötilan mukaiseksi. Kun alukkeet ovat kiinnittyneet, vastinjuoste syntetisoidaan korkeita lämpötiloja sietävän DNA-polymeraasin avulla. Reaktioketjua toistetaan yleensä 20-30 kertaa ennen kuin haluttu määrä DNA:ta saadaan syntetisoitua. (Alberts ym. 2002). Tässä menetelmässä DNA-polymeraasina käytettiin Dynazyme II DNA-polymeraasia (2U/µl, Thermo Scientific), jonka tuotetietojen suositusten mukaan optimoitiin sekä reaktioseos (taulukko 1) että polymeraasiketjureaktio-ohjelma (taulukko 2).

TAULUKKO 1. NAV3-sekvenssin varmistamiseksi suoritettussa polymeraasiketjureaktiossa käytetty reaktioseos.

Vesi	41,5 µl
10xDynazyme puskuri	5 µl
10mM dNTP	1 µl
50µM aluke, forward	0,5 µl
50µM aluke, reverse	0,5 µl
DNA-templaatti (1pg-10ng)	1 µl
Dynazyme II polymeraasi (2U/µl)	0,5 µl
yhteensä	50 µl

TAULUKKO 2. NAV3-sekvenssin varmistamiseksi tehdyssä polymeraasiketjureaktiossa käytetty PCR-ohjelma.

Vaihe	Lämpötila	Aika	
Denaturaatio	94 ⁰ C	2min	
Denaturaatio	94 ⁰ C	20s	x30
Alukkeiden kiinnittyminen	64 ⁰ C	20s	
Pidentyminen (ekstensio)	72 ⁰ C	10s	
Loppuekstensio	72 ⁰ C	5min	
Säilytyslämpötila	5 ⁰ C	∞	

Polymeraasiketjureaktiosta saatu tuote voidaan tunnistaa ja havaita agarosigeelielektroforeesin avulla. Negatiivisesti varautuneet DNA-molekyylit kulkevat sähkökentässä kohti positiivista napaa (anodia). Koska pienet DNA-molekyylit kulkevat agarosigeelillä nopeammin kuin suuret, voidaan molekyylit erottaa geeliltä kokonsa mukaan. DNA-molekyylien kulkemaa matkaa voidaan verrata samalla geelillä ajautuvaan DNA-kokostandardiin, jossa on useita tunnetun kokoisia DNA-molekyyliä. Vertaamalla tuntemattoman molekyylin kulkemaa matkaa tunnettuun "molekyylikarttaan", voidaan tuntemattoman molekyylin koko määrittää suhteellisen tarkasti.

Geelille tulisi aina pipetoida myös negatiivinen kontrolli. Negatiivisen kontrollin tulee olla mukana myös polymeraasiketjureaktiossa. Negatiivinen kontrolli sisältää näytettä lukuun ottamatta samat

reagenssit kuin tutkittava näyte. Elektroforeesissa ajautuneet DNA-molekyylit ovat näkymättömiä ellei niitä värjätä esimerkiksi etidiumbromidilla, joka fluoresoi UV-valossa. Tässä menetelmässä käytettiin 50 ml 1 % agarosigeeliä, johon lisättiin 5 µl etidiumbromidia. Etidiumbromidi on mutaageninen aine, joten sen käsittelyssä ja hävittämisessä tulee olla varovainen. Geelirajo kesti n. 45 min 90 V jännitteellä, jonka jälkeen haluttu tuote (n. 1000 emäsparia) voitiin havaita UV-valon avulla. Jos tuotetta ei näy geelillä, polymeraasiketjureaktio on epäonnistunut tai kasvatettu bakteerikloonikanta ei sisällä BAC-vektoria.

5.3 BAC (bacterial artificial chromosome)-DNA:n eristys

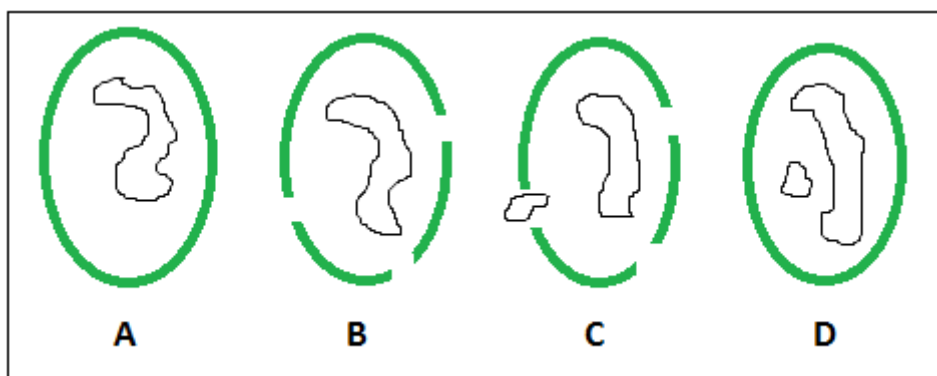
Kun oikean kokoinen tuote (n.1000 emäsparia) on nähty agarosigeelillä, voidaan bakteerista tehdä massakasvatus sekä varastoliuos steriiliin glyseroliin. Varastoliuos tehtiin sekoittamalla 0,8 ml stationäärifaasin kasvatususta 0,2 ml:aan steriiliä glyserolia. Varastoliuos säilytetään -70°C:ssa. Massakasvatuksessa 50 µl bakteerikasvatusta lisättiin 500 ml:aan kloramfenikolia (12,5 µl/ml) sisältävää LB-liuosta ja kasvatettiin 12-16 tuntia 37°C:ssa voimakkaassa ravistelussa (250 rpm), kunnes spektrofotometrillä mitattaessa OD₆₀₀ on välillä 3-4. Bakteerimassa siirrettiin 50 ml sentrifuugiputkiin ja sentrifugoitiin 3000 G:ssä 10 minuuttia 4°C:ssa. Bakteerisakka voidaan säilyttää -20°C:ssa.

BAC-DNA:n eristys suoritettiin PhasePrep BAC DNA kitillä (Sigma-Aldrich) kitin ohjeiden mukaisesti. Eristetty DNA liuotettiin 25-50 µl:aan steriiliä vettä riippuen sakan koosta ja konsentraatio mitattiin spektrofotometrisesti aallonpituudella 260 nm. DNA:n määrää arvioitiin myös agarosigeelielektroforeesin avulla havainnoimalla fluoresoivan DNA-raidan vahvuutta geelillä UV-valon alla. Agarosigeelielektroforeesi suoritettiin samalla tavalla kuin luvussa 5.2. Näytteisiin merkattiin eristyspäivämäärä sekä kloonin nimi ja näytteet säilöttiin -20°C:een.

5.4 CEN-plasmidin transformointi *E. coli*in, bakteerin kasvatus ja plasmidi-DNA:n eristys

Kromosomi 12 sentromeerialueen koetin (CEN 12) toimii testin sisäisenä kontrollina ja sen avulla voidaan havaita myös kromosomi 12 polysomia, jolloin kromosomin lukumäärä solussa poikkeaa normaalista kahdesta. Polysomia pidetään ensimmäisenä muutoksena, joka voi johtaa geneettisiin poikkeavuuksiin kuten yksittäisten geenien deleetioihin tai amplifikaatioihin.

CEN12-geenialueen sisältäviä pA12H8-plasmideja tilattiin American Type Culture Collectionilta (ATCC). Geenialueen monistamista varten plasmidit transformoitiin *E. coli* JM101 -kantaan. Transformaatioissa DNA siirtyy bakteerin sisälle. Vastaanottavan solun on oltava kompetentti, jolloin solun soluseinää on heikennetty niin, että se ottaa herkemmin vierasta DNA:ta sisäänsä. Kompetentteja soluja saadaan käsittelemällä solut jääkylmällä kalsiumkloridilla (CaCl_2). Kuvassa 2 on esitetty plasmidin transformaatio *E. coli*-soluun.

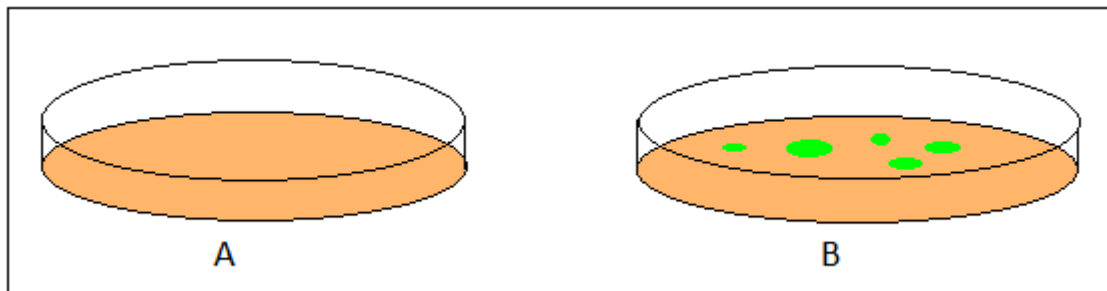


KUVA 2. Plasmidin transformaatio *E. coli*-bakteerisoluun. A. *E. coli*-solu normaali tilassa. B. Kylmäkäsittely aiheuttaa pieniä reikiä bakteerin soluseinään. C. Pienet DNA-molekyylit kuten plasmidit voivat siirtyä näiden reikien läpi bakteerisolun sisään. D. Lämpökäsittely sulkee soluseinän reiät ja osaan bakteereista jää plasmidi solun sisään.

Glyserolistokissa olevia JM101-bakteerisoluja siirrettiin 15 ml:aan LB-kasvatusliuosta ja liuosta kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa ravituksessa. 1ml yön yli kasvaneita bakteereja lisättiin 100 ml:aan LB-liuosta ja kasvatettiin bakteereja 37°C:ssa ravituksessa noin kaksi tuntia kunnes OD₆₅₀ oli 0,2. Soluja sentrifugoitiin 5 min 5000 rpm:ssä 4°C:ssa. Solut suspensoitiin 20 ml:aan jääkylmää 100 mM CaCl_2 :a ja seisoitettiin jäissä 20 minuuttia. Sentrifugointi toistettiin ja solut suspensoitiin 1 ml:aan jääkylmää 100 mM CaCl_2 . Tämän jälkeen 1 µl plasmidia lisättiin 250 µl:aan kompetentteja soluja ja seisoitettiin jäissä 30 minuuttia. Seosta pidettiin tasan 2 minuuttia 42°C:ssa ja lisättiin 750 µl esilämmitettyä (37°C) LB-liuosta ja kasvatettiin noin 60 minuuttia 37°C:ssa. Bakteerit levi-tettiin lasikolmion avulla viidelle esilämmitetylle LB-maljalle, jotka sisälsivät ampisilliinia (100 µg/ml). Bakteeriliuoksen määrä maljoilla oli 50 µl, 100 µl, 100 µl, 200 µl ja 550 µl. Bakteerit laitettiin kasvamaan maljoilla 37°C:seen yön yli.

Plasmidivektorit, joita transformaatioissa käytetään, sisältävät yleensä jonkin selektiogeenin, jotta voidaan tunnistaa solut, jotka ovat ottaneet DNA:ta sisäänsä. Tilaamissamme pA12H8-plasmideissa oli selektiogeeninä ampisilliiniresistenssigeeni. Bakteerisolut, jotka eivät ole ottaneet

plasmidia sisäänsä eivät kasva ampicillinimaljoilla. Bakteerisolut, joihin transformaatio on onnistunut puolestaan muodostavat pesäkkeitä maljalla (kuva 3).



KUVA 3. Transformoitujen bakteerien viljely antibioottia sisältävällä maljalla. A. Bakteerit, joilla ei ole sisällään antibioottiresistenssigeenin sisältävää plasmidia, eivät kasva maljalla. B. Antibioottiresistenssigeenin sisältävän plasmidin sisäänsä ottaneet solut kasvavat maljalla ja muodostavat pesäkkeitä. Pesäke voidaan siirtää kasvatusliemeen, jolloin saadaan puhdasviljelmä.

Yhdellä viidestä ampicillinimaljasta, jolle oli viljelty 200 µl bakteeriliuosta, oli yön yli kasvatuksen jälkeen 3 pesäkettä. Tämän jälkeen yksittäinen pesäke kerätään 6 ml:aan ampicilliinia (100 µg/ml) sisältävää LB-liuosta. Bakteeria kasvatetaan LB-liuoksessa, kunnes bakteeripopulaation kasvu on stationäärifaasissa, jolloin spektrofotometrillä mitattu OD₆₀₀ on 1-2. Koetin sisältää halutun CEN12-geenialueen, jos se sitoutuu metafaasipreparaatissa kromosomin 12 sentromeerialueelle (nähtävissä fluoresenssimikroskoopissa).

Stationäärivaiheessa olevasta bakteerikasvatuksesta voidaan tehdä massakasvatus sekä varastoliuos steriiliin glyseroliin. Varastoliuos tehdään sekoittamalla 0,8 ml stationäärifaasin kasvatusta 0,2 ml:aan steriiliä glyserolia. Liuos säilytetään -70°C:ssa. Massakasvatuksessa 50 µl bakteerikasvatusta lisätään 500 ml:aan ampicilliinia (100 µl/ml) sisältävää LB-liuosta ja kasvatetaan 12-16 tuntia 37°C:ssa voimakkaassa ravistelussa (250 rpm), kunnes spektrofotometrillä mitattaessa OD₆₀₀ on välillä 3-4. Bakteerimassa siirretään 50 ml sentrifuugiputkiin ja sentrifugoidaan 3000 G:ssä 10 minuuttia 4°C:ssa. Bakteerisakka voidaan säilyttää -20°C:ssa.

Plasmidi-DNA:n puhdistuksessa näytteestä poistetaan epäpuhtaudet kuten proteiinit ja RNA. Plasmidin puhdistukseen käytettiin Macherey-Nagelin valmistamaa NucleoBond® Xtra Midi Plasmid Purification -kittiä ja sen ohjeita (liite 2.). Kitin toiminta perustuu sen sisältämien puskuriliuosten tapaan hajottaa bakteerisolut samalla periaatteella kuin NaOH- ja SDS-menetelmällä. Bakteerisolujen hajottamisen jälkeen ioninvaihtopylväs (NucleoBond® Xtra Column) ja siihen sopeva suodatin (NucleoBond® Xtra Co-lumn Filter) tasapainotetaan puskurin avulla, jonka jälkeen näyteliuos kaadetaan suodattimeen. Liuos suodattuu omalla painollaan filterin läpi ja plasmidi-

DNA sitoutuu silikahartsiiin (NucleoBond® Xtra Silica Resin). Kahden pesun jälkeen plasmidi-DNA eluoidaan, saostetaan ja liuotetaan sopivaan puskuriin jatkokäyttöä varten.

5.5 Näytemateriaali ja näytepreparaattien valmistaminen

Näytemateriaalina opinnäytetyössä käytettiin terveestä ja syöpäkudoksesta peräisin olevia paksusuolen tumanäytteitä, solukasvatuksista saatuja PC-3- ja LnCap-syöpäsolulinjoja ja verestä eristettyjä lymfosyyttejä.

5.5.1 Tumaeristys ja tumalasiin valmistaminen

Tumalasiin valmistus perustuu tumien irrottamiseen kudoksen soluista entsyymaattisesti Protease Type XXIV -entsyymillä avulla. Entsyymi rikkoo solun rakenteen mukaan lukien soluväliaineen, solukalvon ja soluliman, jonka jälkeen tumat saadaan kudoksesta irti ravistelemalla. Tumalasiit valmistettiin Oulun yliopistollisen keskussairaalan patologian laboratorion saaduista paksusuolinäytteistä, joista oli tehty 50 µm paksuisia parafiinileikkeitä. Paksusuolinäytteet olivat peräisin sekä normaalista paksusuolikudoksesta että paksusuolensyöpäpotilaan syöpäkudoksesta. Normaalista paksusuolikudoksesta peräisin olevia näytteitä voidaan käyttää kontrollinäytteinä.

Kudoksista poistettiin aluksi parafiini lisäämällä 1,5 ml:n eppendorf-putkessa olevan kudoksen päälle 1 ml UltraClear-liuosta (J.T.Baker). UltraClear on vähemmän myrkyllinen ja karsinogeeninen vaihtoehto ksyleenille parafiinin poistossa. UltraClearin lisäyksen jälkeen putkea ravisteltiin 30 minuuttia käsin tai tasoravistelijalla (100 rpm), jonka jälkeen UltraClear käsittely toistettiin toisella 30 minuutin ja yhdellä 10 minuutin käsittelyllä. Mikäli näyte on pieni eikä laskeudu itsestään putken pohjalle, näytettä voidaan sentrifugoida inkubaatioiden välissä 2000 G:n voimakkuudella. UltraClear-käsittelyn jälkeen näytettä inkuboitiin 10 min Aa-, 85%- ja 70%-etanolissa (laskeva alkoholisarja) edelleen ravistellen näytettä käsin inkuboinnin ajan. Käsittelyn päätteeksi kudosta inkuboitiin vielä kaksi kertaa milliQ-vedessä viiden minuutin ajan.

Parafiinin poiston jälkeen kudokselle tehtiin entsyymaattinen käsittely inkuboimalla näytettä 30 minuuttia Carlsbergin liuoksessa (sis. Protease Type XXVI). Inkubointiaika on riippuvainen käytettävästä näytekudoksesta. Esimerkiksi ihonäytteet vaativat pidempää käsittelyä, jotta tumat irtoavat kudoksesta kuin suolinäytteet. Näytettä vorteksoitiin kymmenen minuutin välein kevyesti, kunnes

näyte on hajonnut. Inkubointiajan päätteeksi näytettä vorteksoitiin 2 minuutin ajan ja annettiin seistä 3 minuuttia.

Näyte suodatettiin seisonta-ajan jälkeen 70 µm nailonverkon läpi, jotta suuret kudospalaset jäävät verkkoon tumien päästessä verkon lävitse. Putken pohjalle jäävät kudospalaset voidaan säilyttää, kunnes ollaan mikroskopoimalla tarkistettu, että tumat ovat irronneet kudoksista. Näyte sentrifugoitiin 2000 G voimakkuudella viiden minuutin ajan, supernatantti poistettiin ja tumasakka liuotettiin 50 µl:aan 0,1 M Tris-HCl(pH7,2) -0,07 M NaCl liuosta. Tumat laimennetaan kristallivioletti/PBS-väriiliukseen. Laimennettua näytettä pipetoitiin 10 µl Bürkerin kammioon ja laskettiin siniseksi värjäytyneet tumat. Tumakonsentraatio laskettiin laimennuskertoimen ja tumien keskiarvon avulla. Lopullisen tumakonsentraation tulee olla noin 1×10^6 tumaa/ml.

Näyteputkiin lisättiin vielä 200 µl 0,1 M Tris-HCl(pH7,2) -0,07 M NaCl puskuria, sekoitettiin ja sentrifugoitiin 2000 G:n voimakkuudella 5 minuutin ajan. Pesuliuos poistettiin ja tumasakka liuotettiin laskettuun puskurimäärään siten, että tumakonsentraatio on oikea. Tumaliuosta pipetoitiin SuperFrost-objektilaseille kahteen tai yhteen kohtaan 5-10 µl. Pisaraa pyöriteltiin pipetin kärjellä lasin pinnalle, jotta tumat sekoittuvat. Neste haihdutettiin yön yli. Objektilaseille merkattiin näytekoodi (juokseva numero) ja tekopäivämäärä. Lasille kirjoitetaan myös, että kyse on tumalasista ja onko näyte kontrolli- vai syöpänäyte.

Seuraavana päivänä tumapisararat merkattiin objektilasin toiselle puolelle esim. rasvakynällä tai timanttikynällä. Näytteitä fiksoitiin 0,1% paraformaldehydissä 4 minuuttia jäällä. Paraformaldehydi poistettiin 2 min PBS-puskurihuuhteluilla. Dehydraatio tehtiin nousevalla alkoholisarjalla inkuboimalla näytteitä 2 min 70%-, 80%- ja Aa-etanolissa sekä lopuksi 10 minuutin ajan metanolissa. Preparaatit varastoidaan -70°C:seen.

5.5.2 Syöpäsolukasvatuksista valmistettujen näytteiden valmistaminen

Kokonaisista syöpäsoluista saatiin preparaatteja fiksaamalla PC-3- ja LNCaP-solulinjojen syöpäsoluja objektilasille. Molemmat solulinjat oli kasvatettu ValiRx:n muiden projektien yhteydessä ja saimme solut käyttöömmme ilman solukasvatusvaiheiden suorittamista. PC-3 on epiteelinen solulinja, joka on peräisin ihmisen eturauhasen adenokarsinooman luussa kasvaneesta etäpesäkkeestä (Kaighn ym. 1979). LNCaP on vastaavasti eturauhasen adenokarsinooman etäpesäkkeesiosta peräisin oleva solulinja (Horoszewicz 1983). Molempia solulinjoja käytetään laajasti etu-

rauhassyövän solumalleina onkologisissa tutkimuksissa. Solut laskettiin Bürkerin kammiossa ja jokaiselle objektilasille levitettiin pisarana noin 5000-10000 solua. Objektilaseille merkattiin näytekoodi (juokseva numero), päivämäärä ja preparaattityyppi. Pisanan annettiin kuivua vetokaapissa, jonka jälkeen solut fiksoitiin kuten tumapreparaatit kappaleessa 5.5.1. Preparaatit varastoitettiin -70°C:seen.

5.5.3 Metafaasilasien valmistaminen

Metafaasilasit ovat objektilaseja, joihin on kiinnitetty metafaasivaiheessa olevia lymfosyyttien kromosomeja. Menetelmä perustuu eristettyjen lymfosyyttien kasvattamiseen PHA:ta tai jotain muuta jakautumista stimuloivaa ainetta sisältävässä elatusaineessa, jolloin lymfosyytit saadaan jakaantumaan metafaasivaiheeseen asti. Soluviljely voidaan lopettaa Colcemidin avulla, minkä jälkeen kasvatetut lymfosyytit käsitellään KCl:llä (hypotoninen liuos), fiksataan ja tiputellaan objektilaseille siten, että kromosomit irtoavat solusta.

Lymfosyyttien eristäminen tehtiin Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare) liuoksen avulla noudattaen liuoksen mukana tulevia lymfosyyttien eristysohjeita. Eristystä varten mitattiin 2 ml EDTA-verta, joka laimennettiin 2 ml:aan Hank'sin balansoitua suolaliuosta (Life Technologies). Sentrifugiputkiin pipetoitiin aluksi 3 ml Ficoll-Paque™ PLUS liuosta, minkä jälkeen laimennettu veri pipetoitiin varovasti liuoksen päälle välttämällä kerrosten sekoittumista. Näyteputkia valmistetaan kerralla useampi. Näytteitä sentrifugoitiin 400 G:ssä 40 minuuttia 20°C:ssa. Sentrifugoinnin aikana näyte kerrostuu siten, että erytrosyytit ja granulosyytit ovat läpäisseet Ficoll-Paque PLUS liuoksen muodostaen pohjakerroksen ja lymfosyytit, monosyytit ja verihiutaleet muodostavat kerroksen Ficoll-Paque™ PLUS:n päälle. Lymfosyyttikerroksen päälle on muodostunut plasmakerros, joka pipetoidaan pois ennen lymfosyyttikerroksen keräämistä. Lymfosyytit kerättiin varovasti pipetoiden uuteen, pyöreäpohjaiseen ja steriiliin näyteputkeen ja näytteeseen lisättiin 6 ml balansoitua suolaliuosta. Solut suspensoitiin liukseen varovasti pipetoimalla ja näyte sentrifugoitiin uudelleen samoilla asetuksilla. Supernatantti poistettiin ja suspensio ja sentrifugointi toistettiin.

Solut suspensoitiin 1 ml:aan Lymphochrome (BioWhittaker®) kasvatusliuosta, joka sisältää valmiiksi PHA:n (phytohemaglutiniini), L-glutamiinin ja antibiootin (gentamysiini) ja on optimoitu valkosolujen kasvattamiseen (Lonza, 2007). Soluista tehtiin 1:10 laimennos Trypaanin siniseen ja solut laskettiin Bürkerin kammiossa. Lopullisen kasvatusliuoksen määrä laskettiin niin, että 10 ml:ssa kasvatusliuosta on n. 10×10^6 solua. Solut laitettiin kasvamaan pieneen kasvatuspulloon

oikeaan määrään kasvatusliuosta (yleensä 5 ml) ja kasvatusliuokseen lisättiin 10% FBS:ää (500 µl 5 ml:aan kasvatusliuosta). Soluja kasvatettiin kolme vuorokautta 37°C:ssa (5% CO₂).

Soluviljelyn lopetus tehtiin lisäämällä 5 ml soluviljelyyn 150 µl Colcemid-liuosta ja inkuboimalla näytettä 1-1,5h 37°C:ssa. Inkubointiajan jälkeen solut kaadettiin 10 ml pyöreäpohjaisiin putkiin ja sentrifugoitiin 6 min 800 RPM:n voimakkuudella. Supernatantti kaadettiin pois ja soluihin lisättiin 2,5 ml 0,075 M KCl:a, joka on esilämmitetty 37°C:seen. Solut sekoitettiin pipetin avulla ja inkuboitiin 3 minuuttia 37 °C:ssa. Solut sentrifugoitiin uudelleen (6 min, 800 RPM) ja samalla valmistettiin fiksatiiviksi 3:1 metanoli-etikkahappo-liuos. Fiksaus tapahtui lisäämällä metanoli-etikkahappo-liuosta aluksi tippa kerrallaan hyvin sekoittaen ja lopulta hitaasti pipetoiden samalla sekoittaen, kunnes sentrifuugiputki on täynnä. Soluja sentrifugoitiin (6 min, 800RPM) ja supernatantti poistettiin nopeasti kaataen. Fiksaus toistettiin kolme kertaa ja lopulta solut jätettiin 250-1000µl:aan fiksatiivia riippuen solusakan koosta. Soluja voidaan säilyttää jääkaapissa tai tiputella suoraan objektilaseille 50°C vesihauteen päällä. Sekä KCl-käsittelyaikaa että korkeutta, josta solut tiputetaan laselle saatetaan joutua muokkaamaan siten, että objektilaseille saadaan kromosomiryppeitä, jotka ovat irronneet soluista, mutta ovat edelleen ryppeissä. Metafaasipreparaatit fiksoitiin kuten luvussa 5.5.1.

5.6 DNA:n leimaus ja koettimien saostus

DNA-koettimet leimataan ns. nick-translaatiomenetelmällä, jossa käytetään DNAasi- ja DNA polymeraasi I -entsyymeitä. DNAasi-entsyymi tekee katkoksia DNA:n sokeri-fosfaattiselkärankaan, joita DNA polymeraasi I laajentaa poistamalla nukleotideja ja sitten korvaa poistamansa nukleotidit leimatuilla (dUTP) että leimaamattomilla (dNTP) nukleotideilla. Leimatut nukleotidit saavat DNA:n fluoresoimaan koettimen sitoutumiskohdassa hybridisoinnin jälkeen fluoresenssimikroskoopissa. DNA-materiaalina käytetään sekä NAV3-geenialueen osia sisältävää eristettyä BAC-DNA:ta (BAC36P3 ja BAC136F16) että kromosomi 12 sentromeerialueen DNA:ta sisältävää plasmidi-DNA:ta (CEN 12). Sentromeerialueen DNA leimataan vihreällä Atto 488 dUTP:lla ja NAV3-alueen BAC-DNA punaisella Alexa 594 dUTP:lla.

Kaikki vaiheet suoritetaan autoklavoiduilla välineillä käyttäen steriilejä, RNAasi- ja DNAasi-vapaita reagensseja sekä puhtaita työtasoja. Työvaiheet suoritetaan jäällä tai kylmäblokillä (-20°C).

Ennen leimaamista valmistettiin entsyymisekoitus, joka sisälsi sekä DNAasi:n että DNA polyme-raasi I:sen. Entsyymisekoituksen sisältö on esitetty taulukossa 3.

TAULUKKO 3. Koettimien leimaamiseen käytettävä entsyymisekoitus.

	BAC-DNA	CEN12-DNA
Ster milliQ vesi	11,6µl	11,8µl
10x DNA polymerase puskuri	5µl	5µl
BSA	1µl	1µl
Glyseroli	25µl	25µl
DNA polymeeraasi I	6µl	6µl
Dnaasi	1,4µl	1,2µl
yhteensä	50µl	50µl

DNaasin määrää voidaan säädellä sen mukaan, kuinka tehokkaasti entsyymisekoitus pilkkoo DNA:ta. Glyserolin ja DNaasin lisäyksen jälkeen entsyymisekoitusta tulee sekoittaa huolellisesti ja sentrifugoida. DNA polymeerasi I säilytetään kylmäblokillä ja se lisätään myös entsyymisekoituk-seen kylmäblokillä. Muut vaiheet voidaan suorittaa jäällä.

Leimaus suoritettiin 0,5 ml eppendorf-putkissa. Leimatut alukkeet suojataan valolta joko ruskeilla putkilla tai folioon käärimällä. Leimauksessa käytetyt reaktioseokset on esitelty taulukoissa 4 ja 5.

TAULUKKO 4. CEN12-koettimen leimaukseen käytetyt reaktioseokset.

CEN12	1x	5x
Plasmidi-DNA	1-1,5µg	5-7,5µg
10x DNA pol puskuri	5µl	25µl
0,5mM d(GAC)TP	4µl	20µl
0,1mM dTTP	1,67µl	8,35µl
0,1M DTT	5µl	25µl
Atto 488 dUTP-NT	1µl	5µl
Entsyymiseos	5µl	25µl
Ster milliQ vesi	x	x
yhteensä	50µl	250µl

TAULUKKO 5. NAV3-koettimien leimauksessa käytetty reaktioseos.

NAV3 BAC	1x	5x
BAC-DNA	1-1,5µg	5-7,7µg
10 x DNA pol puskuri	5µl	25µl
0,5mM d(GAC)TP	5µl	25µl
0,1mM dTTP	12,5µl	62,5µl
0,1M DTT	5µl	25µl
Alexa Fluor 594 dUTP	0,6µl	3µl
Entsyymiseos	5µl	25µl
ster milliQ vesi	x	x
yhteensä	50µl	250µl

Veden määrä lasketaan riippuen käytetyn DNA:n konsentraatiosta siten, että yhden reaktioseoksen lopputilavuudeksi saadaan 50 µl. Ennen leimaamista entsyymiseoksen tehokkuus voidaan testata tekemällä leimausseos ilman leimattua dUTP:ta. Tällöin d(GAC)TP, dTTP ja leimattu dUTP korvataan 5 µl:lla (CEN12-reaktioseos) ja 6 µl:lla (NAV3 BAC-reaktioseos) 0,5 mM dNTP:tä. Sekä testiseos että leimausseokset siirrettiin PCR-laitteelle, jossa niitä inkuboitiin 15°C:ssa 60 min ja 72°C:ssa 15 min. Nick-translaatioreaktio tapahtuu 15°C:ssa ja DNAasi I aktiivisuus deaktivoidaan 72°C:ssa.

Nick-translaatioreaktion onnistuminen ja entsyymiseoksen tehokkuus tarkistetaan agarosielektroforeesilla. Reaktioon käytettiin 5 µl näytettä ja 1 µl 5x latauspuskuria. Agarosigeelinä käytettiin 1% geeliä ja geeliä ajettiin 90 V:n jännitteellä 45 minuutin ajan. Koettimet ovat sopivan kokoisia, jos geelillä nähdään UV-valon alla alle 600 emäsparin pituisia DNA-fragmentteja tasaisena "valumana". Jos koettimet ovat pilkkoutuneet liikaa tai liian vähän, entsyymiseosta joudutaan optimoimaan siten, että DNAasi I:n määrää vähennetään tai lisätään. Jouduimme muokkaamaan entsyymiseosta siten, että DNAasi I:n määrä vähennettiin BAC DNA:lle 0,8 µl:aan ja CEN12 DNA:lle 1 µl:aan. Kun koettimet on saatu haluttuun kokoonsa, leimattuihin koettimiin lisätään 5 µl 0,5 M EDTA:ta (pH 8,0)/ 50 µl reaktio.

Koettimet saostettiin pipetoimalla 0,5 ml tai 1,5 ml eppendorf-putkiin kaikki kolme koetinseosta, NaAc ja etanoli taulukon 6 mukaisesti. Koettimia saostetaan viiden tai kymmenen hybridisointikerran käyttöeriin riippuen hybridisoitavien näytteiden määrästä.

TAULUKKO 6. Koettimien saostusohje yhdelle, viidelle ja kymmenelle käyttöerälle

	1x	5x	10x
Alexa 594 BAC 36P3	1,5µl	7,5µl	15µl
Alexa 594 BAC 136F16	1,5µl	7,5µl	15µl
Atto 488 Cen 12	1,5µl	7,5µl	15µl
3M NaAc pH 5,2	0,45µl	2,25µl	4,5µl
Aa etanoli	14,85µl	74,25µl	148,5µl

Näytteet sekoitettiin hyvin ja inkuboitui -70°C:ssa 1h ajan sekoittaen 15 minuutin välein. Inkubointiajan jälkeen näytteet sentrifugoitiin 13000 RPM:n voimakkuudella 4°C:ssa 30 minuutin ajan. Supernatantti poistettiin pipetoimalla ja sakan päälle lisättiin 50 µl 70% etanolia/1x saostusseos. Näytettä sentrifugoitiin 13000 RPM:n voimakkuudella 10 min ja pesu toistettiin kaksi kertaa. Koetinsakkaa kuivattiin pimeässä n. 10 minuutin ajan 37°C:ssa lämpöblokkissa tai PCR-laitteessa.

Saostuneet koettimet liuotettiin Human cot 1 -DNA:han (Life Technologies) ja MM20%-liuokseen. Sakka liuotetaan ensin hyvin Human cot 1 -DNA:han, jonka tarkoituksena on ehkäistä koettimien epäspesifistä hybridisaatiota. Human cot 1 -DNA koostuu istukasta peräisin olevista 300-600 emäsparin kokoista DNA-fragmenteista ja DNA:ta on rikastettu mm. Alu- ja Kpn-geeniperheistä peräisin olevilla toistojaksofragmenteilla. Kun koetinsaostumat on saatu täysin liuotettua Human cot -DNA:han, voidaan koettiin lisätä MM20%-liuos. Koettimien liuotuksessa käytetyt liuosmäärät on esitetty taulukossa 7. Saostetut koettimet merkitään putkeen huolellisesti ja putkia säilytetään -70°C:ssa.

TAULUKKO 7. Saostuneiden koettimien liuutusohjeet.

	1x	5x	10x
Human cot 1 -DNA	2µl	10µl	20µl
MM20%	8µl	40µl	80µl

5.7 Näytteiden esikäsittely

Näytteet esikäsitellään fluoresenssi *in situ* hybridisaatiota varten. Solu- ja metafaasipreparaatteja esikäsitellessä 20 mM Tris-Cl pH 7,5/ 2 mM CaCl₂ (proteaasi K -puskuri) esilämmitettiin värjäysmaljassa ja eppendorf-putkessa 37°C:seen. Tumapreparaatit otettiin -70°C:sta pois ja sulatettiin. Näytteitä inkuboitii jäällä minuutin ajan 4%:ssa paraformaldehydissä, jonka jälkeen ne pestiin kahden minuutin ajan 1xPBS-liuoksessa. Näytteet asetettiin esilämmitettyyn värjäysmaljaan proteinaasi K -puskuriin ja inkuboitii 5 minuutin ajan. Tämän jälkeen suoritettiin näytteiden käsittely proteinaasi K:lla, joka oli laimennettu esilämmitettyyn proteinaasi K -puskuriin (0,66 µg/ml) 37°C:ssa 8 minuutin ajan. Proteinaasikäsittelyn jälkeen näytepreparaatit huuhdeltiin proteinaasi K -puskurissa ja dehydroitiin nousevalla alkoholisarjalla (70%-, 85%- ja Aa-etanolikäsittely) 2 minuutin ajan. Preparaatit ilmakeivattiin ja jatkettiin hybridisaatioon. Esikäsittely voidaan tehdä myös ilman proteinaasi K -käsittelyä, mutta entsyymikäsittely lisää solujen läpäisevyyttä ja siten helpottaa koettimien hybridisoitumista.

Ennen tumapreparaattien esikäsittelyä 10 mM sitraattipuskuri esilämmitettiin värjäysmaljassa vesihautteella 80 °C:seen. Myös 20 mM Tris-Cl pH 7,5/ 2 mM CaCl₂ (proteaasi K -puskuri) esilämmitetään värjäysmaljassa 37°C:seen värjäysmaljalla ja Eppendorf-putkessa. Tumapreparaatit sulatettiin ja siirrettiin nopeasti esilämmitettyyn sitraattipuskuriin noin 15 minuutiksi (suositeltu aika 15-25 minuuttia). Preparaatit pestiin kaksi kertaa 2xSSC-liuoksessa 3 minuutin ajan tasoravistelijalla tai käsin ravistellen. Näytteitä inkuboitii 5 minuutin ajan esilämmitetyssä proteinaasi K -puskurissa, jonka jälkeen näytteitä käsiteltiin 8 minuuttia 37°C:ssa proteinaasi K:lla, joka oli laimennettu proteinaasi K -puskuriin pitoisuudeksi 8 µg/ml. Näytteet dehydroitiin proteinaasi K -käsittelyn jälkeen nousevalla alkoholisarjalla (70 %-, 85 %- ja Aa-etanoli) 2 minuutin ajan. Näytteet kuivattiin ja hybridisoitiin.

5.8 FISH ja post-hybridisaatiopesut

Fluoresenssi *in situ* hybridisaatiossa fluoresoiva koetin ja näytteen nukleiinihappo saadaan sopivissa olosuhteissa hybridisoitumaan komplementaarisuuden eli yhteisen emäsparijärjestyksen vuoksi. Hybridisoimalla koetin esimerkiksi metafaasipreparaattiin, voidaan fluoresenssimikroskooppilla tarkastella koettimen sijaintia kromosomeissa sekä geenin kopiokokumäärän muutoksia.

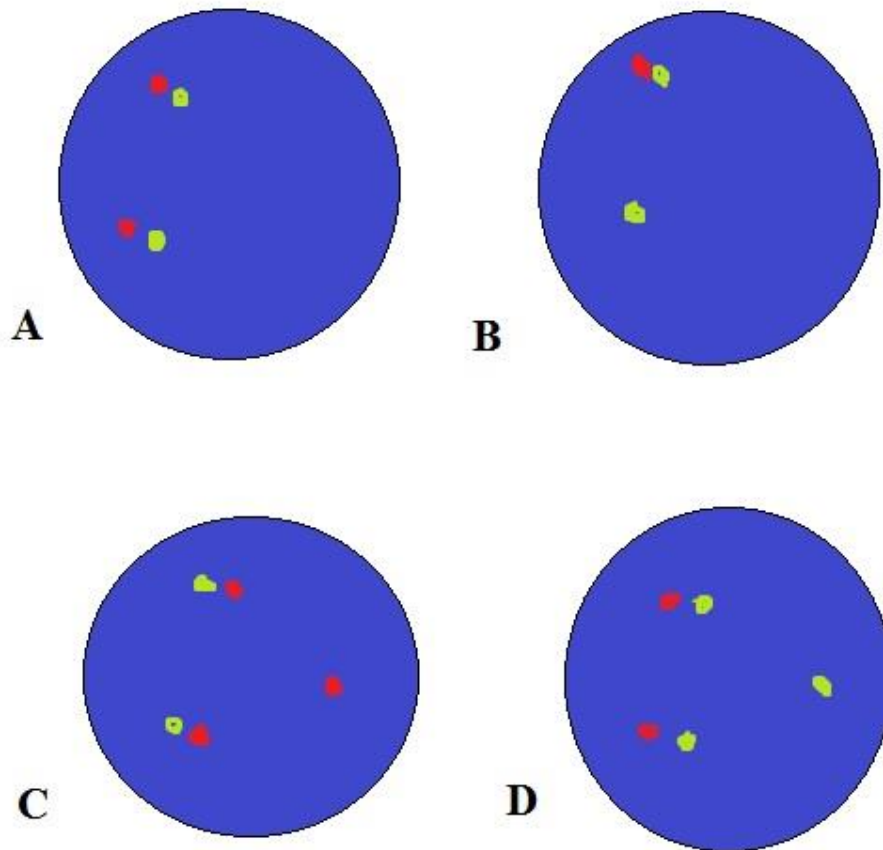
Hybridisaatio suoritettiin pipetoimalla 10 µl saostettua koetinseosta näytteen päälle ja peittämällä näytepaikka pienellä peitinlasilla. Näytteet denaturoidaan lämpölevyllä tai hyvin esilämmitetyssä lämpökaapissa. Tumapreparaatteja denaturoitiin 6 minuuttia 85°C:ssa ja solu- ja metafaasipreparaatteja 3-5 minuuttia 75°C:ssa. Denaturoinnin jälkeen näytteet asetetaan tiiviseen ja kosteutta sisältävään hybridisaatiokammioon tai muoviasiaan ja hybridisoidaan 37°C:ssa 20-72 tuntia.

Hybridisaation jälkeen näytteille tehdään post-hybridisaatiopesut. Ennen pesuja suoritettiin 1,5 M urea/0,1xSSC -liuoksen esilämmitys neljässä värjäysmaljassa vesihautteen (48°C) avulla. Liuoksen lämpötilaa tarkkailtiin lämpömittarilla. Lämpötilan tulisi olla jokaisessa värjäysmaljassa 47°C. Näytteet pestiin esilämmitetyssä 1,5 M urea/0,1xSSC -liuoksessa aluksi 5 minuutin ajan ja lopuissa värjäysmaljoissa 10 minuutin ajan. Pesun aikana objektilaseja kannattaa heilutella pesuliuksessa, jotta peitinlasit irtoavat kunnolla näytteen päältä. Pesuja jatkettiin inkuboimalla näytteitä 3x2 minuuttia huoneenlämmössä PBS/0,1%Tween -liuoksessa ravistellen värjäysmaljoja joko käsin tai tasosekoittajalla. Näytteet on tässä vaiheessa hyvä suojata valolta. Näytteet huuhdeltiin lopuksi nopeasti milliQ-vedellä ja ilmakuivattiin huoneenlämmössä ja pimeässä. Näytteet vastavärjättiin 1:25 laimennetulla DAPI-liuoksella pipetoimalla liuosta 25 µl jokaisen näytekohdan päälle ja asettamalla objektilasin päälle 24x60 mm peitinlasi. Vastavärjäys värjää solut taustaltaan siniseksi, jolloin punaisten ja vihreiden fluoresenssisignaalien erottaminen on helpompaa. Jos DAPI-liuos ei ole jähmettyvää, peitinlasi on hyvä kiinnittää esimerkiksi liimalla. Näytteet mikroskopoidaan ja analysoidaan fluoresenssimikroskoopilla mahdollisimman pian ja säilytetään 2-8°C:ssa valolta suojattuna.

5.9 Näytteiden analysointi fluoresenssimikroskoopilla

Hybridisaation jälkeen näytteet on hyvä analysoida fluoresenssimikroskoopilla kahden vuorokauden sisällä, mutta viimeistään viikon kuluttua hybridisaatiosta luotettavan tuloksen saamiseksi. Näytteet säilyvät kuitenkin jääkaappilämpötilassa vuosia ja ne voidaan hybridisoida uudelleen.

NAV3-geenin kopiolumäärää voidaan analysoida vertaamalla NAV3-geenin signaaleja (punaisia) sentromeeri 12 -spesifiisiin signaaleihin (vihreät). Syöpäsoluissa NAV3-geenissä saattaa esiintyä deleetioita (sentromeerien signaaleja enemmän kuin NAV3-geenin signaaleja eli vihreitä signaaleja enemmän kuin punaisia) tai amplifikaatioita (NAV3-geenin signaaleja enemmän kuin sentromeerien signaaleja eli punaisia signaaleja enemmän kuin vihreitä). Kopiolumäärän muutoksien aiheuttamat muutokset solussa näkyviin fluoresenssisignaaleihin on esitetty kuvassa 4.



KUVA 4. NAV3 (punainen) ja CEN12 (vihreä) kopyiolukumuutoksien aiheuttamat muutokset solujen fluoresenssisignaaleissa. A. Normaali solu, jossa on kaksi NAV3-signaalia ja kaksi CEN12-signaalia. B. Syöpäsolu, jossa NAV3-deleetio (punaisia pisteitä vain 1). C. Syöpäsolu, jossa NAV3-amplifikaatio (punaisia pisteitä enemmän kuin 2). D. Syöpäsolu, jossa CEN12-amplifikaatio (vihreitä pisteitä enemmän kuin 2).

Analysoidessa on tärkeää, että signaaleiden laskija ei tiedä, mitkä näytteet toimivat kontrolleina ja mitkä ovat potilasnäytteitä. Jokaisen tumen signaalit lasketaan erikseen. Jos kaksi signaalia on erittäin lähellä toisiaan, ne lasketaan yhdeksi. Jakautunut signaali voi johtua DNA:n kondensaation vaihtelusta eikä kopyiolukumäärän vaihtelusta. Näytteessä voi myös esiintyä fluorokromiartefaktia, jota ei saa laskea varsinaiseksi signaaliksi. Koettimien epäspesifi sitoutuminen voi aiheuttaa analysointia vaikeuttavaa fluoresoivaa taustaa.

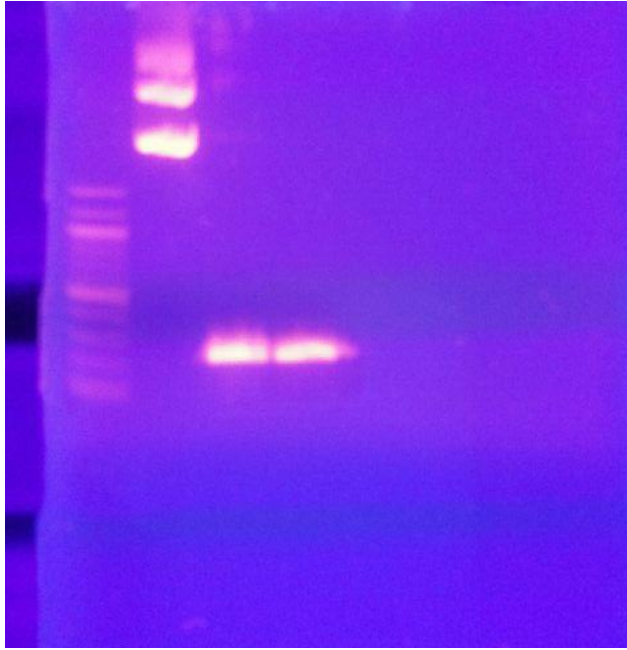
6 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän projektin tarkoituksena on kehittää fluoresenssi *in situ* hybridisaatioon perustuvaa NAV3-syöpämerkkiainegeenitestä Valifinnin ja Oulun ammattikorkeakoulun laboratoriotiloihin soveltuvaksi laadukkaaksi menetelmäksi. Tavoitteena oli saada suoritettua kaikki työvaiheet onnistuneesti ja työn tulokseksi näytteitä, joiden solujen NAV3-geenin kopiolukua pystyi tarkastelemaan fluoresenssimikroskoopilla.

6.1 BAC-vektorin sisältävien bakteerien kasvatus ja PCR

Tilatut BAC-vektorin sisältävät bakteerit maljattiin kloramfenikolia sisältäville LB-maljoille ja maljoja viljeltiin yön yli 37°C:ssa. Maljoilta, joilla oli bakteerikasvua, eristettiin yksittäisiä pesäkkeitä, jotka laitettiin kasvamaan 6ml:aan LB-liuosta, jossa oli kloramfenikolia 12,5 µg/ml. Bakteereja kasvatettiin 37°C:ssa vuorokauden ajan, kunnes kasvustosta mitattu OD₆₀₀ oli yli 1. Tämän jälkeen PCR-reaktiolla varmistettiin, että kasvatettu bakteeriklони sisältää halutun geenialueen sisältävän BAC-vektorin.

PCR-reaktio tehtiin NAV3-geenialueelle suunnitelluilla alukkeilla. PCR:n jälkeen suoritettiin agarosegeelelektroforeesi 1% geelillä. Jouduimme optimoimaan PCR-reaktiota Dynazyme-entsyymin kittiohjeiden avulla ja kokeilemaan reaktiota eri DNA-pitoisuuksilla muokaten SOP-ohjeita, sillä aluksi emme nähneet lainkaan PCR-tuotetta geelillä. Kuvassa 5 on esitetty PCR-tuotteet sisältävä geelikuva. Geelillä havaittiin halutun kokoiset BAC-DNA:sta NAV3-geenialueelle suunnitelluilla alukkeilla monistetut PCR-tuotteet (n. 1000 bp), joten eristetty BAC-DNA sisälsi varmasti NAV3-geenin.



KUVA 5. Eristetyn BAC-DNA:n ja NAV3-PCR:n agarosigeelikuva. Kaivo 1. kokostandardi, kaivo 2. eristetty BAC-DNA, kaivo 3. BAC 36p3:stä monistettu PCR-tuote, kaivo 4. BAC136f16:stä monistettu PCR-tuote ja kaivo 5. negatiivinen kontrolli.

Koska geelillä löytyi oikean kokoinen tuote, tehtiin bakteerista massakasvatus sekä varastostokki steriiliin glyseroliin. Ensimmäinen massakasvatus ei onnistunut. Massakasvatuksen OD_{600} jäi alle 3 (tavoite 3-4), joten bakteerit eivät olleet kasvaneet niin paljon kuin tavoite oli. Syy tähän oli todennäköisesti liian hidas ravistelijä (n. 100 rpm) tai liian pieni kasvatusastia, jolloin happea ei sekoittunut tarpeeksi kasvustoon. Massakasvatus uusittiin tehokkaammalla ravistelijalla (>250 rpm). Tämän jälkeen OD_{600} oli yli 3. Bakteerimassa siirrettiin 50 ml sentrifugiputkiin ja sentrifugoitiin 3000G:ssä 10 minuuttia 4°C:ssa. Bakteerisakka säilöttiin -20°C:ssa.

BAC-DNA:n eristys suoritettiin PhasePrep BAC-DNA kitin ohjeiden mukaisesti. Eristetty DNA-sakka liuotettiin steriiliin veteen, DNA-liuokset yhdistettiin ja konsentraatio mitattiin spektrofotometrisesti aallonpituudella 260 nm. BAC-DNA:n pitoisuus oli liian pieni laskettavaksi, joten DNA:n määrää arvioitiin agarosigeelielektroforeesilla (kuva 5, kaivo 2) silmämääräisesti. Geelillä näkyy vahvasti useampikin fluoresoiva DNA-juova, joten BAC-DNA:n eristys oli onnistunut laimeasta DNA-konsentraatiosta huolimatta. DNA-juovia on useampi, koska osa DNA:sta on hajonnut kooltaan pienemmäksi. Agarosigeelielektroforeesi suoritettiin luvun 5.2 ohjeiden mukaan.

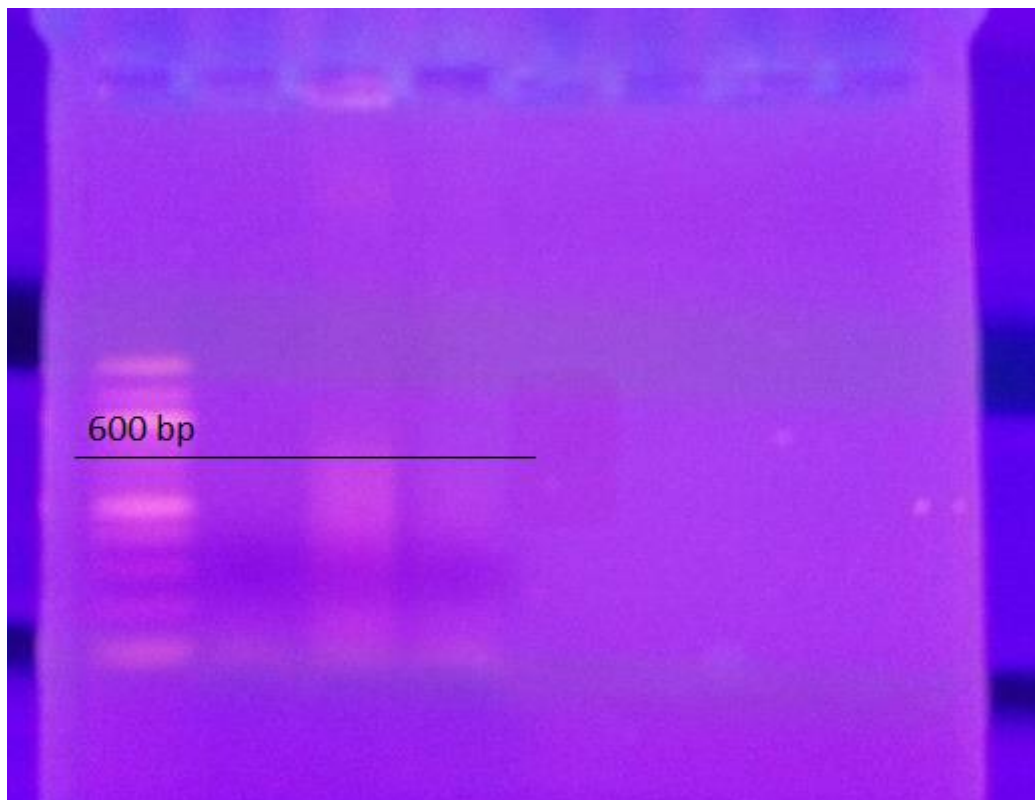
6.2 CEN-plasmidin transformointi *E. coli*n, bakteerin kasvatus ja plasmidi-DNA:n eristys

Viidelle ampicilliinimaljalle tehdyistä viljelyistä transformaatio oli onnistunut vain yhdellä maljalla, jolla kasvoi kolme bakteeripesäkettä yön yli kasvatuksen jälkeen. Yksittäinen pesäke laitettiin kasvamaan yöksi 6 ml:aan ampicilliinia sisältävää LB-lientä. Yksi pesäkkeistä kerättiin 6 ml:aan ampicilliinia sisältävää LB-liuosta ja bakteeria kasvatettiin LB-liuoksessa yön yli, jonka jälkeen OD_{600} oli 1.8 eli bakteeripopulaation kasvu oli stationäärifaasissa.

Tämän jälkeen bakteerista tehtiin massakasvatus sekä varastostokki steriiliin glyseroliin. Massakasvatuksessa onnistui heti ensimmäisellä kerralla hyvin, sillä 16 tunnin kasvatuksen jälkeen OD_{600} mitattiin 3.8 (tavoite 3-4). Massakasvatusliemi sentrifugoitiin ja bakteerisakat säilöttiin pakaseen myöhempää käsittelyä varten. Plasmidi-DNA:n eristys ja puhdistus NucleoBond® Xtra Midi Plasmid Purification -kitillä onnistui hyvin.

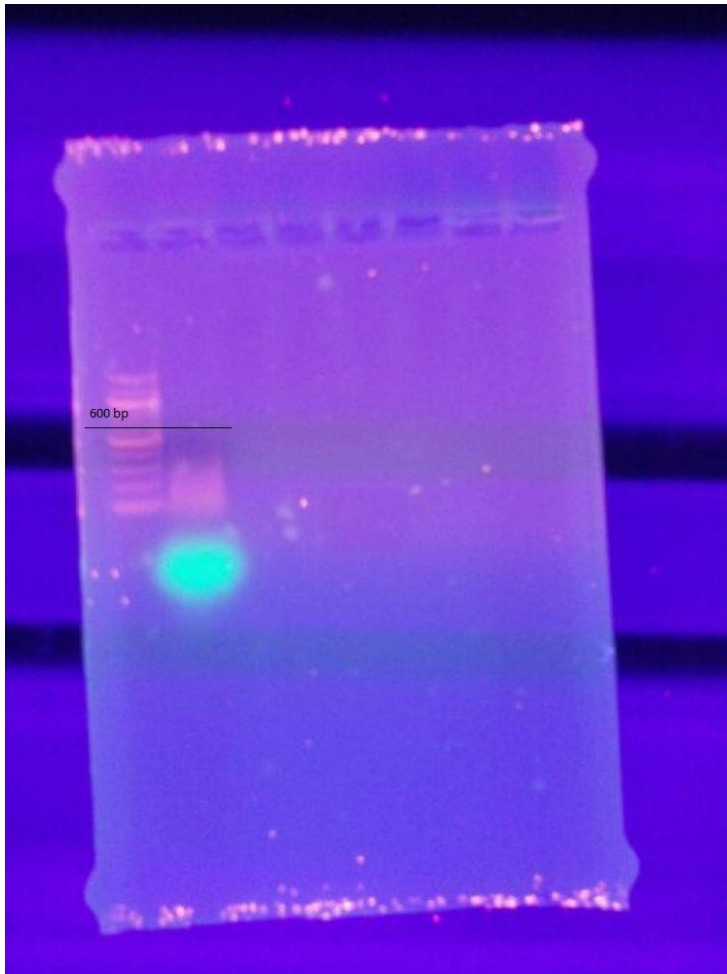
6.3 DNA:n leimaus ja koettimien saostus

Leimaaminen suoritettiin luvun 5.4. ohjeiden mukaan. Ennen leimaamista valmistettiin entsyymisekoitus, joka sisälsi sekä DNAasi:n että DNA polymeraasi I:sen. BAC-DNA:n leimausta varten teimme kolme leimausreaktiota, joissa BAC-DNA:n tilavuus vaihteli. DNA:n tilavuudet olivat 5 μ l, 10 μ l ja 15 μ l, jolloin veden tilavuudet vastaavasti olivat 11,9 μ l, 6,9 μ l ja 1,9 μ l. BAC-DNA:n määrää leimausreaktioissa ei pystytty laskemaan, koska eristetyn BAC-DNA:n DNA konsentraatio oli niin pieni, ettei sitä voitu määrittää spektrofotometrillä. Ennen leimaamista entsyymiseoksen tehokkuus testattiin tekemällä leimausseos ilman leimattua dUTP:ta. Leimausseos siirrettiin PCR-laitteelle, jossa sitä inkuboitiin 15°C:ssa 60 min ja 72°C:ssa 15 min. Agarosielektroforeesin (90 V, 45 min, 1% agarosigeeli) jälkeen havaittiin koettimien pilkkoutuneet liian pieniksi, joten muokkasimme entsyymiseosta siten, että DNAasi I:n määrä vähennettiin BAC-DNA:lle 0,8 μ l:aan. Uudella entsyymiseoksella nick-translaatio saatiin onnistumaan paremmin. Koettimet näkyvät geelillä tasaisena valumana 600 bp alapuolella (kuva 6). Kaivossa 1 on kokostandardi. Kaivossa 2 on leimausseos, jossa BAC-DNA:ta 5 μ l, kaivossa 3 on leimausseos, jossa BAC-DNA:ta 10 μ l ja kaivossa 4 leimausseos, jossa BAC-DNA:ta 15 μ l. Vahvin valuma on kolmannessa kaivossa, joten optimaalisin BAC-DNA:n tilavuus leimausreaktiossa oli 10 μ l käytetyllä entsyymiseoksella.



KUVA 6. BAC-DNA:sta nick-translaatio-menetelmällä pilkotut koettimet. Kaivo 1. kokostandardi, kaivo 2. leimausseos, jossa DNA:ta 5 μ l, kaivo 3. leimausseos, jossa DNA:ta 10 μ l, kaivo 4. leimausseos, jossa DNA:ta 15 μ l, kaivo 5. negatiivinen kontrolli. 1% agaroosigeeli, 90 V, 45 min.

Koska CEN12-insertin sisältävän plasmidi-DNA:n konsentraatio oli huomattavasti BAC-DNA:ta suurempi, voitiin leimausreaktiossa käyttää paljon pienempää määrää eristettyä DNA:ta. Sopivaa konsentraatiota testattiin useilla geelijaioilla ja lopulta parhaan tuloksen antoi steriiliin veteen 1:10 laimennettu plasmidi-DNA, jota laitettiin leimausreaktioon 3 μ l. Kyseisellä laimennoksella pilkotut koettimet on esitetty kuvassa 7. Kun BAC- ja CEN12-koettimet oltiin saatu optimaalisen kokoiseksi (vahva valuma alle 600 emäsparia), koettimet saostettiin ja liuotettiin taulukoiden 6 ja 7 mukaisesti.



KUVA 7. Plasmidi-DNA:sta nick-translaatio-menetelmällä pilkotut CEN12-koettimet. Kaivo 1. kostandardi, kaivo 2. pilkotut ja leimatut koettimet ja kaivo 3. negatiivinen kontrolli. 1% agarosigeeli, 90 V, 45 min.

6.4 Näytteiden valmistaminen

Näytteiksi valmistettiin tumalaseja, soluviljelmistä objektilaseille fiksoituja syöpäsoluja ja metafaasilaseja.

6.4.1 Tumaeristys ja tumalasien valmistaminen

Tumalasit valmistettiin paksusuolensyöpäkudoksesta, josta oli tehty 50 µm paksuisia parafiini-leikerullia. Kontrollilaseja valmistettiin normaalista paksusuolikudoksesta. Tumalasit valmistettiin luvun 5.5.1 ohjeen mukaisesti. Parafiinin poiston jälkeen kudoksenäytteille tehtiin entsymaattinen käsittely inkuboimalla näytettä Carlsbergin liuoksessa 30 minuuttia. Vaikka parafiinin poiston jäl-

keen kudospalaset vaikuttivat isoilta, 30 minuutin entsymaattinen käsittely riitti hajottamaan kudosta riittävästi, jotta tumat saatiin eristettyä suodattamalla.

Kun tumat oli saatu eristettyä, tumakonsentraatio laskettiin Bürkerin kammion avulla. Tumasakka liuotettiin pesujen jälkeen 500 µl:aan 0,1M Tris-HCl(pH7,2)-0,07M NaCl:ta, jolloin tumakonsentraatioksi saatiin haluttu 1×10^6 tumaa / ml. Tumaliuosta pipetoitiin SuperFrost-objektilaseille kahteen tai yhteen kohtaan 5 tai 10 µl. Seuraavana päivänä lasit fiksoitiin 0,1% paraformaldehydissä, suoritettiin pesut PBS-puskurilla ja dehydraatio nousevalla alkoholisarjalla. Lasit varastoitettiin -70°C:seen. Hybridisoinnin jälkeen lasit mikroskoipoitiin fluoresenssimikroskoopilla, jossa ilmeni, että tumaeristykset olivat onnistuneet hyvin ja sekä 5 µl että 10 µl näytemäärä oli riittävä näytteiden analysointiin.

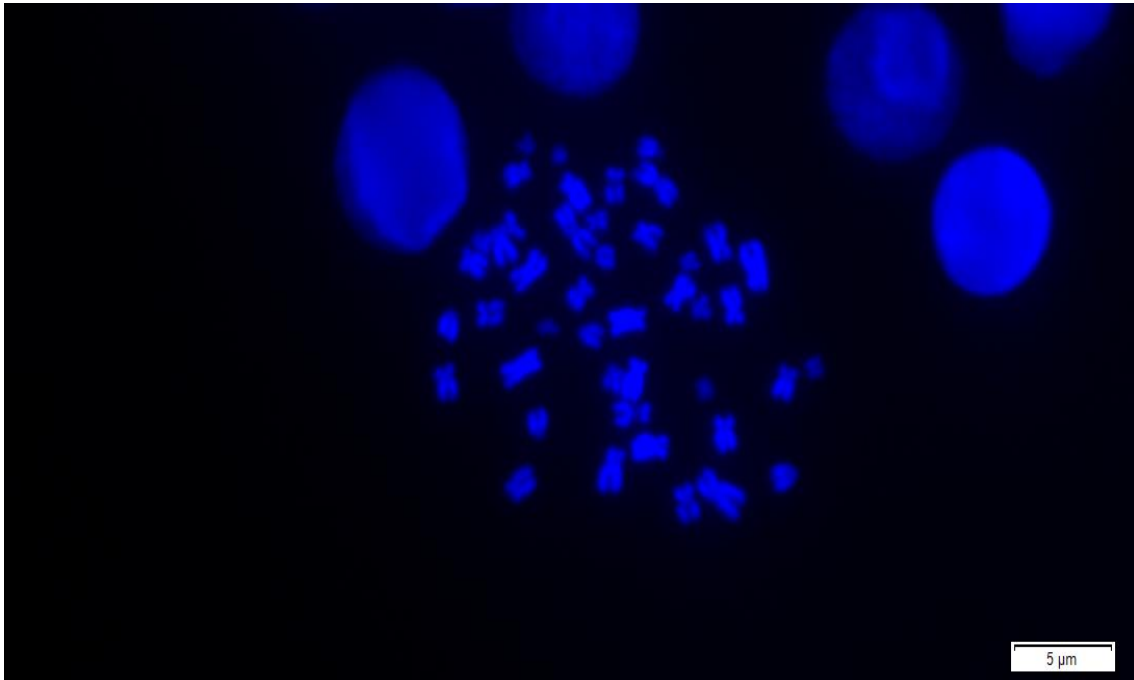
6.4.2 Metafaasilasien valmistaminen

Lymfosyyttien eristäminen tehtiin Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) liuoksen avulla noudattaen liuoksen mukana tulevia lymfosyyttien eristysohjeita (luku 5.5.3). Solut suspensoitiin 1 ml:aan Lymphochrome (BioWhittaker) kasvatusliuosta. Soluista tehtiin 1:10 laimennos Trypaanin siniin ja solut laskettiin Bürkerin kammiossa. Lopullisen kasvatusliuoksen määrä laskettiin niin, että 10 ml:ssa kasvatusliuosta on n. 10×10^6 solua. Solujen kasvatus ja soluviljelyn lopetus suoritettiin luvun 5.5.3 ohjeiden mukaisesti.

Lymfosyyttien eristäminen onnistui Ficoll-Paque Plus-tekniikalla melko hyvin ja eristetystä lymfosyyttisolusakasta saatiin kohtuullisen kokoinen ja solut saatiin kasvamaan suhteellisen helposti. Kasvatettujen solujen fiksauksessa oli kuitenkin tärkeää, että solusakkaa ei rikottu pipetoimalla vaan metanoli-etikkahappofiksatiivi kaadettiin nopeasti pois, jotta solut eivät kadonneet fiksauksen aikana. Menetelmän suorittaminen vaatii muutaman yrityskerran, sillä solusakka oli erittäin liukeneva ja katosi fiksausvaiheen aikana helposti.

Solut jätettiin solusakan koosta riippuen 250-1000 µl:aan metanoli-etikkahappofiksatiivia, jolloin solujen määrä objektilasilla oli sopiva analysointiin. Soluja tiputeltiin pisara tai kaksi suoraan objektilaseille pasteur-pipetillä 50°C vesihauteen päällä vaihdellen tiputuskorkeutta. Tiputuskorkeudella voitiin säädellä tumien rikkoutumista siten, että kromosomit levisivät lasille, mutta niiden alkuperä samasta tumasta voitiin todeta (kuva 8). Kromosomit hajosivat objektilasille osittain, mutta suurin osa soluista säilyi ehjinä, jolloin kromosomeja ei voinut nähdä fluoresenssimikroskoopissa.

Suurempi onnistumisprosentti voidaan saavuttaa pidentämällä KCl-käsittelyaikaa tai tiputtamalla solut objektilaseille korkeammalta.

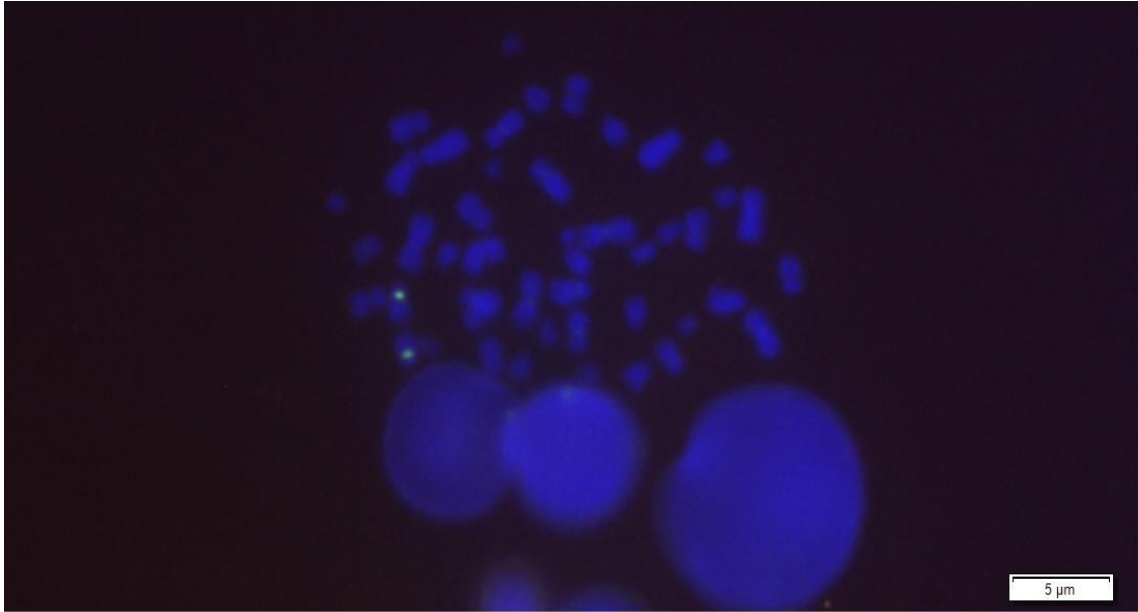


KUVA 8. Metafaasilasilla olevia metafaasivaiheen kromosomeja fluoresenssimikroskoopilla kuvattuna

6.5 Hybridisaatio ja näytteiden analysointi mikroskoopilla

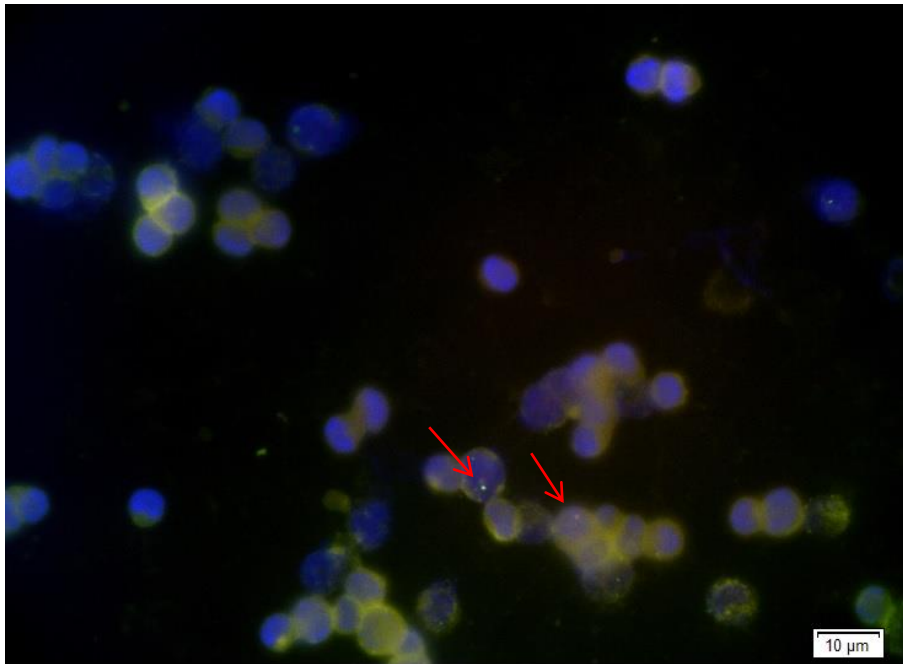
Näytteet analysoitiin fluoresenssimikroskoopilla Biocenter Oulun tiloissa, sillä Oulun ammattikorkeakoulun tiloissa oleva fluoresenssimikroskooppia ei saatu ajoissa toimintaan eikä mikroskoopilla nähty fluoresenssia positiivisella kontrollilla.

CEN12-koettimen fluoresenssi saatiin hyvin näkyville etenkin metafaasilaseilla, joilla koetin oli sitoutunut hybridisaatiossa kromosomin 12 sentromeerialueelle (kuva 9). Samalla voitiin varmistua siitä, että bakteerikannasta eristetty plasmidi-DNA todella sisälsi CEN-alueen sekvenssin. NAV3-koettimien fluoresenssia (punainen) ei valitettavasti nähty hajonneiden solujen kromosomeissa hybridisoinnin jälkeen, joten koettimet eivät toimineet optimaalisesti. Punaisena fluoresoivia pisteitä näkyi kuitenkin soluissa, jotka eivät olleet hajonneet, joten NAV3-koettimet olivat kuitenkin hybridisoituneet osaan soluja.



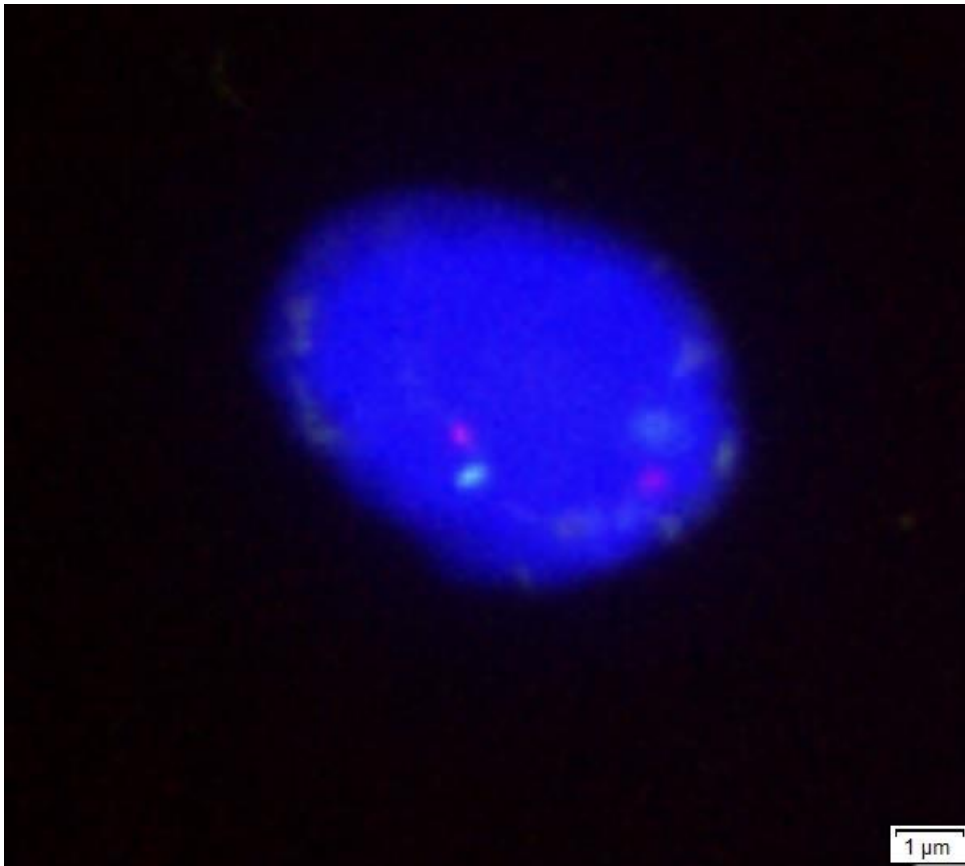
KUVA 9. Metafaasilaseilla fluoresenssimikroskoopissa näkyviä metafaasivaiheessa olevia kromosomeja sekä hybridisoituneen CEN12-koettimen fluoresenssisignaali (vihreä) kromosomien 12 sentromeerialueella.

Soluviljelmistä suoraan objektilaseille fiksoidut syöpäsolut eivät toimineet hybridisoinnissa yhtä hyvin kuin tumaeristykset, sillä kokonaisissa soluissa näkyi paljon taustafluoresenssia sekä epäspesifiä koettimien sitoutumista ja signaalien erottaminen oli haastavaa (kuva 10). Parhaiten hybridisoituivat CEN12-koettimet, joiden signaalit kyettiin erottamaan osassa soluista myös taustafluoresenssista huolimatta.



KUVA 10. LNCap-syöpäsolulinjan soluja, joissa näkyy taustafluoresenssia ja epäspesifiä koettimien sitoutumista sekä muutama mahdollisesti oikea CEN12-fluoresenssisignaali (nuolet).

Tumaeristyksissä sekä NAV3- että CEN12-koettimien signaaleja nähtiin eniten (kuva 11). Signaalit olivat kuitenkin usein heikosti fluoresoivia ja myös tumapreparaateissa näkyi jonkin verran epäspesifiä koettimien sitoutumista sekä taustafluoresenssia. Tumapreparaatit toimivat kuitenkin huomattavasti solupreparaatteja spesifimmin ja analysointi oli helpompaa. Tulevaisuudessa koettimia tulee kuitenkin optimoida siten, että signaalit saadaan voimakkaammiksi ja koettimet hybridisoituvat useampien solujen tumiin. Optimoinnissa tulee kiinnittää erityistä huomiota esimerkiksi eristetyn DNA:n pitoisuuteen ja koettimien pilkkomiseen siten, että koettimen pituutta testataan hybridisoinnin tehostamiseksi.



KUVA 11. Eristetty tuma, jossa näkyy sekä NAV3(punainen)- että Cen12(vihreä)- fluoresenssi-signaaleja.

7 POHDINTA

Projekti kokonaisuutena oli hyvin mielenkiintoinen ja haastava. Aikaisempi koulutuksemme biologi- ja genetiikan alalta antoi meille hyvät lähtökohdat opinnäytetyön tekoon, sillä molemmilla oli tieto- ja kokemuspohjaa molekyylibiologisista tutkimusmenetelmistä. Oppimisen kannalta työ oli kuitenkin erittäin antoisa.

Erilaisia työskentelytekniikoita ja työvaiheita oli monia ja aluksi niiden kaikkien hahmottaminen tuntui hankalalta. Eri työvaiheiden merkitys ja työ kokonaisuudessaan alkoi kuitenkin selkiytyä nopeasti sen jälkeen, kun projekti oli aloitettu. Työvaiheiden järjestys sekä niiden merkitys kokonaisuuden onnistumiselle korostui työssä vastaan tulleiden ongelmien kautta. Ongelmatilanteissa jouduimme suurelta osin itse pohtimaan ja selvittämään ongelmien syitä. Näissä tilanteissa hyödyimme aiemman koulutuksen aikana hankituista tiedosta ja taidoista.

Fluoresenssi *in situ* hybridisaatio on menetelmänä hyvin herkkä ja menetelmän haastavuutta lisää olosuhteiden herkkyys eri tekijöille. Olosuhteet tuleekin testata aina laboratoriokohtaisesti. Myös koettimen valmistus on vaikeaa, sillä koetinfragmenttien tulee olla tarpeeksi pitkiä ollakseen riittävän spesifejä, mutta kuitenkin tarpeeksi lyhyitä, jotta ne tunkeutuvat solun sisälle herkemmin ja hybridisoituvat tehokkaasti. Koska pipetoitavat määrät ovat hyvin pieniä, on siis tärkeää, että pipetit on hyvin kalibroitu. Myös pipetoinnin suorittajan on hyvä olla kokenut, jotta pipetoitujen liuosten tilavuus pysyy tasaisesti samana.

Saimme huomata, että työskentelyn tuli olla todella tarkkaa, sillä esimerkiksi pieni pipetointivirhe tai liian vähäinen näytteen sekoitus saattoivat estää koko työvaiheen onnistumisen. Tarkemmat työohjeet ja hieman paremmin varusteltu laboratorio olisivat tuoneet todennäköisesti helpotusta moniin työvaiheisiin. Oli kuitenkin hyvin palkitsevaa keksiä ongelmien syyt, löytää niihin toimiva ratkaisu ja saada hybridisaatio lopulta onnistumaan. Projektin ansiosta saimme lisää kokemusta laajan ja monivaiheisen laboratoriotyön suunnittelusta ja toteutuksesta sekä myös tietomme ja taitomme käytettäviamme menetelmien osalta syveni oleellisesti.

Laitteiston kartoitus ja reagenssien tilaaminen suoritettiin kartoittamalla jo valmiina olevat tarvikkeet ja reagenssit ja tekemällä puuttuvista listaa. Uudet liuokset valmistettiin työohjeiden mukai-

sesti onnistuneesti. Ennen bakteerien tilaamista suunnittelimme NAV3-geenialueelle alukkeet Primer 3-ohjelmalla. Alukkeet toimivat alusta asti hyvin, kun PCR-ohjelma saatiin optimoitua käyttämällemme entsyymille sopivaksi.

Bakteerien kasvatus onnistui aluksi huonosti, sillä käyttämämme sekoittaja ei ollut tarpeeksi tehokas bakteerien riittävän hapetuksen saavuttamiseksi. Tehokkaampaa sekoittajaa käyttäen bakteerit saatiin kasvamaan nopeammin ja eristyksessäkin saatiin hieman korkeampia DNA-pitoisuuksia. DNA-pitoisuudet jäivät silti liian alhaiseksi, joten tulevaisuudessa eristykseen kannattaa mahdollisesti kokeilla toista BAC-DNA:lle tarkoitettua erityskittiä.

Tumapreparaattien tekeminen oli suhteellisen helppoa ja menetelmä onnistui hyvin. Hybridisaation onnistumisen kannalta oleellista on, että soluja ei fiksoida liian kauan ja esikäsittelyt optimoidaan. Esikäsittelyissä voidaan tulevaisuudessa kiinnittää huomiota sitraattipuskurikäsittelyn aikaan ja proteinaasi-K:n konsentraatioon. Metafaasipreparaattien tekemisessä tulisi ottaa huomioon KCl-käsittelyn aika ja fiksoitujen solujen tiputtamiskorkeus objektilasille. Preparaattien tekemiseen olisi hyvä laatia tulevaisuudessa selkeät menetelmätyöohjeet, kunhan menetelmät on optimoitu.

Koettimet eivät vielä hybridisoituneet tarpeeksi hyvin laadukasta kopiolumäärän analysointia varten, joten koettimien valmistuksen optimointiin on edelleen käytettävä työtunteja. Tärkeää on myös koettimien saaminen sellaiseksi, että ne toimivat hyvin kaikenlaisilla näyttemateriaaleilla. Koettimien tekemisessä voi kiinnittää huomiota esimerkiksi eristetyn BAC-DNA:n pitoisuuteen, sillä omissa eristyksissämme DNA:n pitoisuus jäi pieneksi. Myös koettimien kokoa voi koittaa muunnella säätämällä DNAasi I:n määrää leimausreaktiossa. Taustafluoresenssia voi pyrkiä vähentämään esimerkiksi liuottamalla koettimet suurempaan määrään Human Cot-DNA:ta, joka vähentää epäspesifiä sitoutumista. Liuotusvaiheessa on myös erittäin tärkeää varmistua siitä, että koetinsakka on liuennut täydellisesti Human Cot-DNA:han ennen MM20:n lisäämistä, sillä muuten koettimet eivät hybridisoidu tehokkaasti. Hybridisaatio-olosuhteissa tulee olla tarkkana ja esimerkiksi lämpölevyn käyttäminen lämpökaapin sijaan varmistaa paremmin oikean denaturaatiolämpötilan. Denaturaatiolämpötilaa voi myös kokeilla vaihdella, sillä oikea lämpötila vaihtelee yksittäisten näytteiden ja kudostyyppien mukaisesti.

Tulevaisuutta ajatellen laboratoriokohtaisten ohjeiden tulee olla hyvin tarkasti laadittu ja etenkin koettimen tekijän mahdollisuuksien mukaan aina sama henkilö. Laadunvalvonta on näin herkässä

menetelmässä erittäin tärkeää ja esimerkiksi liuosten ja reagenssien säilytystilojen olosuhteita tulee tarkkailla ja teko- ja vanhenemispäivämääriä seurattava.

NAV3-syöpämarkkerimenetelmä on hyvin lupaava tulevaisuuden diagnostinen työkalu, jonka käyttöönotto on tärkeää, sillä tutkimusten mukaan geenillä on yhteys lukuisiin syöpiin ja myös merkitystä tiettyjen syöpätyyppien ennusteisiin. Tuloksemme olivat lupaavia menetelmän käytännöllisyyden kannalta, sillä jo alkuvaiheessa hybridisaatio saatiin onnistumaan osittain, vaikka näytteiden analysointi ei vielä onnistunut. Tulevaisuudessa hybridisaatio-olosuhteet todennäköisesti saadaan optimoitua OAMK:n ja Valifinnin laboratoriotiloihin sopiviksi.

8 LÄHTEET

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Water, P. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4. painos. Garland Science.

Bayani, J. & Squire, J. 2008. Fluorescence *In situ* Hybridization. Teoksessa Molecular Biotechnology Handbook. Walker, J. & Rapley, R. (toim.) Totowa: Humana Press, 239–255.

Bleeker, FE., Lamba, S., Rodolfo, M., Scarpa, A., Leenstra, S., Vandertop, WP & Bardelli, A. 2009. Mutation profiling of cancer candidate genes in glioblastoma, melanoma and pancreatic carcinoma reveals a snapshot of their genetic landscapes. Human mutation 30, E451-E459.

Carlsson, E. 2012. Neuron navigator 3 (NAV3) gene aberrations in human cancer: copy number variations and target genes. Helsinki: Unigrafia.

Carlsson, E., Krohn, K., Ovaska, K., Lindberg, P., Häyry, V., Maliniemi, P., Lintulahti, A., Korja, M., Kivisaari, R., Hussein, S., Sarna, S., Niiranen, K., Hautaniemi, S., Haapasalo, H. & Ranki, A. 2012a. Neuron navigator 3 alterations in nervous system tumours associate with tumor malignancy grade and prognosis. Genes, Chromosomes & Cancer 52, 191-201.

Carlsson, E., Ranki, A., Sipilä, L., Karenko, L., Abdel-Rahman, WM., Ovaska, K., Siggberg, L., Aapola, U., Ässämäki, R., Häyry, V., Niiranen, K., Helle, M., Knuutila, S., Hautaniemi, S., Peltomäki, P. & Krohn, K. 2012b. Potential role of a navigator gene NAV3 in colorectal cancer. British Journal of Cancer 106, 517-524.

Hahtola, S., Burghart, E., Puputti, M., Karenko, L., Abdel-Rahman, WM., Väkevä, L., Jeskanen, L., Peltomäki, P., Klein, CA. & Ranki, A. 2008b. Cutaneous T-cell lymphoma-associated lung cancers show chromosomal aberrations differing from primary lung cancer. Genes Chromosomes Cancer 47, 107-117.

Horoszewicz, JS., Leong, SS., Kawinski, E., Kar, JP., Rosenthal, T & Chu, TM. 1983. LNCap Model of Human Prostatic Carcinoma. Cancer Research 43. 1809-1818.

Kaighn, ME., Narayan, KS., Ohnuki, Y., Lechner, JF. & Jones, LW. 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative Urology* 17. 16-23.

Karenko, L., Hahtola, S., Päivinen, S., Karhu, R., Syrjä, S., Kähkönen, M., Nedoszytko, B., Kytölä, S., Zhou, Y., Blazevik, V., Pesonen, M., Nevala, H., Nupponen, N., Sihto, H., Krebs, I., Poustka, A., Roszkiewicz, J., Saksela, K., Peterson, P., Visakorpi, T. & Ranki, A. 2005. Primary cutaneous T-cell lymphomas show a deletion or translocation affecting NAV3, the human UNC-53 homologue. *Cancer research* 65, 8101-8110.

Knuuttila, S. 2006. Geenit kromosomeissa: sytogenetiikan perusteet. Teoksessa *Perinnöllisyyslääketiede*. Aula, P. Kääriäinen, H. Palotie, A. (toim.) 3. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C.A & Palladino, M.A. 2009. *Concepts of Genetics* (9. painos). Pearson & Prentice Hall.

Lonza. 2007. Product information, Lymphochrome media. Viitattu 20.1.2015. <http://www.biocenter.hu/pdf/lymphochrome.pdf>.

Martinez-Lopez, MJ., Alcantara, S., Mascaro, C., Perez-Branguli, F., Ruiz-Lozano, P., Maes, T., Soriano, E. & Buesa, C. 2005. Mouse neuron navigator 1, a novel microtubule-associated protein involved in neuronal migration. *Molecular and cellular neurosciences* 28 No. 4, 599-612.

NCBI. 2015. NAV3, neuron navigator 3. (Homo sapiens (Human)). Viitattu 16.1.2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/89795>.

Pukkala, E., Sankila, R., Rautalahti, M. 2011. *Syöpä Suomessa 2011. Suomen syöpäyhdistyksen julkaisuja nro 82*. Suomen syöpäyhdistys, Helsinki.

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. *Geenitekniikka*. Turun ammatti-korkeakoulu.

Tuinala, J. 2005. *Bioinformatiikan perusteet*. 1. painos. CSC Tieteellinen laskenta Oy. Helsinki. 85-87

Tönnies, H. 2002. Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics. *TRENDS in Molecular Medicine* Vol. 8 No 6:246 – 250.

Wilkinson D.G. 1998. The theory and practice of in situ hybridization. In *Situ Hybridization: A Practical Approach*, Oxford University Press s.1 – 20.

Williams, MT. & Hord, NG. 2005. The role of dietary factors in cancer prevention: Beyond fruits and vegetables. *Nutrition in Clinical Practice*. 20, 451-459.

Wood, LD., Parsons, DW., Jones S., Lin J., Sjoblom, T., Leary, RJ., Shen, D., Boca SM., Barber, T., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Detzo, Z., Ustyanksky, V., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Karchin, R., Wilson, PA., Kaminker, JS., Zhang, Z., Croshaw, R., Willis, J., Dawson, D., Shipitsin, M., Willson, JK., Sukumar, S., Polyak, K., Park, BH., Pethiyagoda, CL., Pant, PV., Ballinger, DG., Sparks, AB., Hartigan, J., Smith, DR., Suh, E., Papadopoulos, N., Buckhaults, P., Markowitz, SD., Parmigiani, G., Kinzler, KW., Velculescu, VE. & Vogelstein, B. 2007. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318, 1108-1113.

9 LIITTEET

LIITE 1. Liuosten valmistusohjeet

1 M CaCl₂

Valmistettaessa 200 ml 1M CaCl₂-liuosta, lasketaan punnittava CaCl₂ määrä seuraavasti:

$$m = CVM$$

$$C = 1 \text{ mol/l}, V = 0.2 \text{ l}, M = 147.02 \text{ g/mol}$$

$$m = 1 \text{ mol/l} \times 0.2 \text{ l} \times 147.02 \text{ g/mol} = 29.404 \text{ g}$$

CaCl₂-jauhetta punnitaan 29.404 g ja liuotetaan dekantterissa lähelle 200 ml:aa milliQ vettä. Liuos täytetään 200 ml:n merkkiin mittapullossa milliQ vedellä. Liuos sterilisoidaan painamalla se ruiskulla 0.22 m steriilisuodatimen läpi. Sterilointi tehdään laminaarikaapissa. Valmis liuos kaadetaan steriloituun säilytyspulloon. Steriilisuodatettu 1M CaCl₂-liuos säilytetään huoneenlämmössä, jossa se säilyy käyttökelpoisena yhden vuoden.

Carlsbergin liuos

Carlsbergin liuoksen koostumus on seuraava: 0.1 % Protease Type XXIV, 0.1 M Tris-Cl pH 7.2, 0.07 M NaCl. Valmistettaessa 100 ml Carlsbergin-liuosta, lasketaan tarvittavat Protease Type XXIV, 1 M Tris-Cl ja 1 M NaCl määrät seuraavasti:

Protease Type XXIV:

$$0.1\% \text{ proteaasi} = 0.1 \text{ g}/100 \text{ ml}$$

1 M Tris-Cl pH 7.2:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C_1 = 1 \text{ mol/l}, C_2 = 0.1 \text{ mol/l}, V_1 = X, V_2 = 0.1 \text{ l}$$

$$V_1 = 0.1 \text{ mol/l} \times 0.1 \text{ l} / 1 \text{ mol/l} = 0.01 \text{ l} = 10 \text{ ml}$$

1 M NaCl:

$$C_1 = 1 \text{ mol/l}, C_2 = 0.07 \text{ mol/l}, V_1 = X, V_2 = 0.1 \text{ l}$$

$$V_1 = 0.07 \text{ mol/l} \times 0.1 \text{ l} / 1 \text{ mol/l} = 0.007 \text{ l} = 7 \text{ ml}$$

Steriiliin mittalasiin pipetoidaan 10 ml 1 M Tris-Cl-liuosta pH 7.2 ja 7 ml 1 M NaCl-liuosta. Mittalasiin lisätään steriiliä milliQ vettä lähelle 90 ml:n merkkiviivaa. Liuoksen annetaan kylmetä jäissä. 100 mg Protease Type XXIV:ää liuotetaan edellä valmistettuun kylmään puskuriliuokseen. Liuos täytetään 100 ml:n merkkiin steriilillä milliQ vedellä ja sekoitetaan hyvin. Valmis liuos jaetaan säilytysputkiin 8.5 ml:n eriin. Säilytysputket pakastetaan -20°C, jossa se säilyy käyttökelpoisena puoli vuotta.

0.06 µg/ml DAPI-laimennos

Valmistettaessa 1 ml 0.06 µg/ml DAPI laimennosta lasketaan Vectashield Mounting Medium with DAPI:n määrä seuraavasti:

$$C_1=1.5 \text{ µg/ml}, C_2=0.06 \text{ µg/ml}, V_1=X, V_2=1 \text{ ml}$$

$$V_1=0.04 \text{ ml} = 40 \text{ µl}$$

1.5 ml ruskeaan eppendorf-putkeen pipetoidaan 960 µl Vectashield Mounting medium for Fluorescence ja 40 µl Vectashield Mounting Medium with DAPI. Putki sekoitetaan hyvin. Valmis DAPI-laimennos säilytetään jääkaappilämpötilassa (+2-+8°C). DAPI-laimennos on käyttökelpoinen aiemmin vanhenevan valmistusliuoksen vanhenemispäivämäärään saakka.

1M DTT

Valmistettaessa 5 ml 1M DTT-liuosta, lasketaan punnittava DTT määrä seuraavasti:

$$C=1 \text{ mol/l}, V=0.005 \text{ l}, M=154,25 \text{ g/mol}$$

$$m=1 \text{ mol/l} \times 0.005 \text{ l} \times 154,25 \text{ g/mol} = 0,7713 \text{ g}$$

DTT:a punnitaan 0,7713 g analyysivaalla suoraan putkeen ja liuotetaan putkessa ster. milliQ veteen lähelle 5 ml:aa. 1M DTT jaetaan 100-200µl eriin ja pakastetaan -20°C:een.

0.5 M EDTA

Valmistettaessa 200 ml 0.5 M EDTA-liuosta, lasketaan punnittava Titriplex (= EDTA) määrä seuraavasti:

$$C= 0.5 \text{ mol/l}, V= 0.2 \text{ l}, M= 372.24 \text{ g/mol}$$

$$m=0.5 \text{ mol/l} \times 0.2 \text{ l} \times 372.24 \text{ g/mol} = 37.224 \text{ g}$$

Titriplex-jauhetta punnitaan 37.224 g analyysivaalla ja liuotetaan dekanterissa 150 ml:aan milliQ vettä. Koko tilavuutta milliQ vettä ei lisätä kerralla, koska pH:n säätöä varten pitää jättää varaa. EDTA-liuoksen pH säädetään haluttuun arvoon 5 M NaOH-liuoksella. EDTA-liuos asetetaan magneettisekoittajalle ja pasteur-pipetillä lisätään 5 M NaOH:a käyttäen suojakäsineitä ja työtakia. pH:n muutosta seurataan pH-mittarilla noudattaen mittarin vakioitua toimintaohjetta. EDTA alkaa liueta veteen vasta, kun pH on lähellä 8:aa., jolloin liuos muuttuu maitomaisesta kirkkaaksi. Liuos siirretään mittapulloon pH:n ollessa haluttu ja täytetään 200 ml:n merkkiin milliQ vedellä. 0.5 M EDTA-liuosta valmistetaan pH:lla 8.0 ja 9.0. Valmis liuos autoklavoidaan ennen käyttöä. Autoklavoitu 0.5 M EDTA-liuos säilytetään huoneenlämmössä, jossa se säilyy käyttökelpoisena 6 kk.

LB-liuos

500 ml LB-lientä valmistetaan seuraavasti:

1% Tryptoni (5 g)

0,5% hiivauute (2,5 g)

1% NaCl (5 g)

tasataan tilavuus 500 ml:aan steriilillä vedellä

LB-liemi jaettiin kahteen autoklaavipulloon (250 ml/pullo). Molempiin pulloihin lisättiin Bactoagaria pitoisuuteen 1,4 % eli 3,5 g/pullo. Liuos autoklavoidaan, jonka jälkeen pullot säilytetään huoneenlämmössä.

3 M Na-asettaatti (NaAc), pH 5.2

Valmistettaessa 200 ml 3 M Na-asettaatti-liuosta, lasketaan punnittava Na-asettaatin määrä seuraavasti:

$$C=3 \text{ mol/l}, V=0.2 \text{ l}, M=82.04 \text{ g/mol}$$

$$m=3 \text{ mol/l} \times 0.2 \text{ l} \times 82.04 \text{ g/mol} = 49.224 \text{ g}$$

NaAc:a punnitaan 49.224 g analyysivaa'alla ja liuotetaan dekanterissa magneettisekoittajalla milliQ veteen lähelle 200 ml:aa. Liuoksen pH säädetään 5.2:een etikkahapolla. NaAc-liuos pidetään magneettisekoittajalla ja pasteur-pipetillä lisätään etikkahappoa. pH muutosta seurataan pH-mittarilla. Kun pH on 5.2, liuos siirretään mittapulloon ja täytetään 200 ml:n merkkiin milliQ vedellä. Valmis liuos autoklavoidaan ennen käyttöä. Autoklavoitu 3 M NaAc-liuos säilytetään huoneenlämmössä, jossa se säilyy käyttökelpoisena yhden vuoden.

1 M NaCl

Valmistettaessa 200 ml 1M NaCl-liuosta, lasketaan punnittava NaCl määrä seuraavasti:

$$C= 1 \text{ mol/l}, V= 0.2 \text{ l}, M= 58.44 \text{ g/mol}$$

$$m = 1 \text{ mol/l} \times 0.2 \text{ l} \times 58.44 \text{ g/mol} = 11.688\text{g}$$

NaCl-jauhetta punnitaan 11.688 g analyysivaa'alla ja liuotetaan dekanterissa lähelle 200 ml:aa milliQ vettä. Liuos täytetään 200 ml:n merkkiin mittapullossa milliQ vedellä.

Valmis liuos kaadetaan autoklavoinnin kestävässä säilytyspulloon ja autoklavoidaan ennen käyttöä. Autoklavoitu 1M NaCl-liuos säilytetään huoneenlämmössä, jossa se säilyy käyttökelpoisena yhden vuoden.

20 % NaOH

Valmistettaessa 200 ml 20 % NaOH-liuosta NaOH-jauhetta punnitaan 40.0 g analyysivaa'alla ja liuotetaan muovisessa dekantterissa milliQ veteen. Liuos täytetään 200 ml:n merkkiin muovisessa mittapullossa milliQ vedellä. NaOH on vahva emäs, joten käytään suojatakia ja nitrilisuojakäsineitä. Valmis liuos kaadetaan säilytyspulloon. 20 % NaOH-liuos säilytetään huoneenlämmössä, jossa se säilyy käyttökelpoisena yhden vuoden.

1 M Natriumsitraatti

Valmistettaessa 200 ml 1M natriumsitraatti-liuosta, lasketaan punnittava $C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$ määrä seuraavasti:

$$C=1 \text{ mol/l, } V=0.2 \text{ l, } M=294.10 \text{ g/mol}$$

$$m=1 \text{ mol/l} \times 0.2 \text{ l} \times 294.10 \text{ g/mol} = 58.82 \text{ g}$$

Natriumsitraattia punnitaan 58.82 g analyysivaa'alla ja liuotetaan dekantterissa milliQ veteen. Liuos siirretään mittapulloon ja täytetään 200 ml:n merkkiin milliQ vedellä. Valmis liuos kaadetaan säilytyspulloon. 1 M Na-sitraatti liuos säilytetään jääkaappilämpötilassa (+2-+8°C), jossa se säilyy käyttökelpoisena yhden vuoden.

4% Paraformaldehydi/PBS

Valmistettaessa 500 ml 4% paraformaldehydi/PBS-liuosta lasketaan tarvittavat paraformaldehydinin ja 10xPBS:n määrät seuraavasti:

$$4\% \text{ paraformaldehydi: } 500 \text{ ml} \times 0.04 = 20 \text{ g}$$

$$10\text{xPBS: } 500 \text{ ml} / 10 = 50 \text{ ml}$$

Punnitaan analyysivaa'alla 20 g paraformaldehydiä dekantterilasiin ja lisätään 50 ml 10Xpbs mittalasilla. MilliQ vettä mitataan n. 420 ml dekantteriin. Vetokaapissa liuos asetetaan magneettisekoittajalle ja lämmitetään liuosta 50 °C:een. Liuoksen lämpötilaa seurataan dekantterilasiin sijoitettavan lämpömittarin avulla. Liuoksen annetaan olla sekoituksessa ja lopuksi lisätään tipottain 5-M NaOH:a, kunnes liuos on kirkasta. Annetaan liuoksen jäähtyä, jonka jälkeen liuostilavuus täytetään 500 ml:n merkkiin mittapullossa milliQ vedellä. Liuos suodatetaan suodatinpaperin läpi. Liuos jaetaan kartioputkiin 50 ml:n ja 3.75 ml:n eriin ja pakastetaan -20 °C.

0.1% Paraformaldehydi/PBS

Valmistettaessa 150 ml 0.1% paraformaldehydi/PBS-liuosta pipetoidaan 4% paraformaldehydi/PBS-liuosta 3.75 ml mittalasiin ja täytetään 150 ml:n merkkiin PBS liuoksella.

10 x PBS (PBS = phosphate buffered saline)

10xPBS-liuos koostuu: 1.37M NaCl, 27.0 mM KCl, 80.0 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 14.7 mM KH₂PO₄. Valmistettaessa 1 l 10xPBS-liuosta, lasketaan punnittavat NaCl, KCl, Na₂HPO₄·2H₂O ja KH₂PO₄ määrät seuraavasti:

$$\text{NaCl: } C = 1.37 \text{ mol/l, } V = 1 \text{ l, } M = 58.44 \text{ g/mol}$$

$$m = 1.37 \text{ mol/l} \times 1 \text{ l} \times 58.44 \text{ g/mol} = 80.006 \text{ g} = 80.0 \text{ g}$$

$$\text{KCl: } C = 0.027 \text{ mol/l, } V = 1 \text{ l, } M = 74.55 \text{ g/mol}$$

$$m = 0.027 \text{ mol/l} \times 1 \text{ l} \times 74.55 \text{ g/mol} = 2.013 \text{ g} = 2.0 \text{ g}$$

$$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O: } C = 0.080 \text{ mol/l, } V = 1 \text{ l, } M = 177.99 \text{ g/mol}$$

$$m = 0.08 \text{ mol/l} \times 1 \text{ l} \times 177.99 \text{ g/mol} = 14.239 \text{ g} = 14.24 \text{ g}$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4: C = 0.0147 \text{ mol/l, } V = 1 \text{ l, } M = 136.09 \text{ g/mol}$$

$$m = 0.0147 \text{ mol/l} \times 1 \text{ l} \times 136.09 \text{ g/mol} = 2.000 \text{ g} = 2.0 \text{ g}$$

NaCl- (80 g), KCl- (2 g), Na₂HPO₄·2H₂O - (14.24 g) ja KH₂PO₄-jauheet (2 g) punnitaan analyysivaa'alla ja liuotetaan dekantterissa milliQ veteen. Liuos kaadetaan 1000 ml:n mittapulloon ja täytetään 1000 ml:n merkkiin milliQ vedellä. Valmis liuos kaadetaan autoklavoinnin kestävään pulloon ja autoklavoidaan ennen käyttöä. Autoklavoitu 10xPBS-liuos säilytetään huoneenlämmössä, jossa se säilyy käyttökelpoisena yhden vuoden.

PBS / 0.1% NP-40 -liuos

Valmistettaessa 2000 ml PBS / 0.1% NP-40 -liuosta, lasketaan tarvittavat 10 x PBS-liuoksen ja NP-40 Alternativen määrät seuraavasti:

$$10 \times \text{PBS: } 1000 \text{ ml} / 10 = 200 \text{ ml}$$

$$\text{NP-40 Alternative: } 0.001 \times 2000 \text{ ml} = 2 \text{ ml}$$

10 x PBS-liuosta mitataan 200 ml mittalasilla säilytyspulloon, jonne lisätään pipetoimalla 2 ml NP-40 Alternativea. Liuos täytetään milliQ vedellä 2000 ml:n merkkiin. Liuos sekoitetaan hyvin magneettisekoittajalla. Liuos kaadetaan säilytyspulloon. Valmis liuos säilytetään jääkaappilämpötilassa (+2-+8°C), jossa se säilyy käyttökelpoisena yhden kuukauden.

Proteinase K 1 mg/ml varastoliuos

10 mg Proteinase K -jauhetta liuotetaan 10 ml:aan steriiliä milliQ vettä 15 ml:n falcon-putkeen, jotta saadaan 1 mg/ml varastoliuos. Varastoliuos jaetaan 50 µl eriin 500 µl Eppendorf-putkiin ja pakastetaan -20°C:een, jossa se säilyy käyttökelpoisena yhden vuoden.

10 mM Sitraattipuskuri, pH 6.0

Valmistettaessa 1 l 10 mM sitraattipuskuria, pipetoidaan 1.8 ml 1 M sitruunahappoliuosta ja 8.2 ml 1 M natriumsitraattiliuosta 1 l mittapulloon. Liuos täytetään 1000 ml:n merkkiin milliQ vedellä. Liuoksen pH tarkistetaan pH-mittarilla. Jos pH poikkeaa 6.0:sta, säädetään se 6.0:aan valmistusliuksilla. Valmis liuos kaadetaan säilytyspulloon. 10 mM sitraattipuskuri säilytetään jääkaappilämpötilassa (+2-+8 °C), jossa se säilyy käyttökelpoisena yhden kuukauden.

1 M Sitruunahappo, vedellinen

Valmistettaessa 200 ml 1M sitruunahappoliuosta, lasketaan punnittava $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ määrä seuraavasti:

$$C=1 \text{ mol/l, } V=0.2 \text{ l, } M=210.14 \text{ g/mol}$$

$$m=1 \text{ mol/l} \times 0.2 \text{ l} \times 210.14 \text{ g/mol} = 42.028 \text{ g}$$

Sitruunahappoa (vedellinen) punitaan 42.028 g analyysivaa'alla ja liuotetaan dekanterissa milliQ veteen. Liuos siirretään mittapulloon ja täytetään 200 ml:n merkkiin milliQ vedellä. Valmis liuos kaadetaan säilytyspulloon. 1 M sitruunahappoliuos säilytetään jääkaappilämpötilassa (+2-+8°C), jossa se säilyy käyttökelpoisena yhden vuoden.

0.1 x SSC

Valmistettaessa 1000 ml:aa 0.1xSSC-laimennosta, lasketaan tarvittavan 20xSSC liuoksen määrä seuraavasti:

$$0.1xSSC: 1000 \text{ ml}/20=50 \text{ ml}$$

Valmistettaessa 1000 ml:aa haluttua SSC-laimennosta, mitataan 20 x SSC-liuosta ja milliQ vettä seuraavasti:

$$0.1xSSC: 5 \text{ ml } 20xSSC + 995 \text{ ml milliQ H}_2\text{O}$$

Liuos tehdään mittalasissa, ja kaadetaan valmistuksen jälkeen säilytyspulloon. Valmis liuos säilytetään jääkaappilämpötilassa (+2-+8°C), jossa se säilyy käyttökelpoisena 1 kk.

10 x TBE

10x TBE-liuos koostuu: 0,89 M $C_4H_{11}NO_3$, 0,89 M H_3BO_3 ja 20 mM EDTA. Lasketaan tarvittavien reagenssien määrät seuraavasti:

$$\text{Trizma base: } M(C_4H_{11}NO_3) = 121,14 \text{ g/mol}$$

$$\text{Boric acid: } M(H_3BO_3) = 61,83 \text{ g/mol}$$

$$\text{Trizma base: } m = 0,89 \text{ M} \cdot 1 \text{ l} \cdot 121,14 \text{ g/mol} = 108,0 \text{ g}$$

$$\text{Boric acid: } m = 0,89 \text{ M} \cdot 1 \text{ l} \cdot 61,83 \text{ g/mol} = 55,0 \text{ g}$$

$$0.5 \text{ M EDTA (pH 8,0): } C_1V_1 = C_2V_2$$

$$500 \text{ mM} \cdot V_1 = 20 \text{ mM} \cdot 1000 \text{ ml}$$

$$V_1 = 40 \text{ ml}$$

Valmistettaessa 1000 ml 10xTBE -puskuria punnitaan 108,0 g Trizma base ja 55,0 g

Boric acid analyysivaa'alla ja liuotetaan dekantterissa magneettisekoittajalla milliQ veteen. Lisätään 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Kaadetaan liuos mittapulloon ja täytetään

1000:aan milliQ vedellä. Valmis liuos kaadetaan autoklavoinnin kestävään säilytyspulloon. Valmis liuos autoklavoidaan. Autoklavoitu 10xTBE säilytetään huoneenlämmössä, jossa se säilyy käyttökelpoisena yhden vuoden.

1 M Tris-HCl

Valmistettaessa 200 ml 1M Tris-HCl-liuosta, lasketaan punnittava Trizma®-jauhe määrä seuraavasti:

$$C = 1 \text{ mol/l, } V = 0.2 \text{ l, } M = 121.14 \text{ g/mol}$$

$$m = 1 \text{ mol/l} \times 0.2 \text{ l} \times 121.14 \text{ g/mol} = 24.228 \text{ g}$$

Trizma®-jauhetta punnitaan 24.228 g analyysivaa'alla ja liuotetaan dekantterissa 180 ml:aa milliQ vettä. Koko tilavuutta tislattua vettä ei lisätä kerralla, koska pH:n säätöä varten pitää jättää varaa. Tris-HCl-liuoksen pH säädetään haluttuun arvoon väkevällä suolahapolla (37%). Tris-HCl-liuos asetetaan magneettisekoittajalle ja pasteur-pipetillä lisätään väkevää suolahappoa. pH:n muutosta seurataan pH-mittarilla noudattaen mittarin vakioitua toimintaohjetta. Liuoksen lämpötilaa seurataan lämpömittarilla, koska suolahapon lisääminen saattaa nostaa lämpötilaa. Liuoksen lämpötilan tulisi olla huoneenlämpötilassa eli noin 20°C. Lämpötilan noustessa dekantteri siirretään jäille styrox-laatikkoon ja pH säädetään haluttuun arvoon jäillä. Tris-HCl-liuosta valmistetaan pH-arvoilla 7-9. Liuos siirretään mittapulloon pH:n ollessa haluttu ja täytetään 200 ml:n merkkiin milliQ vedellä. Happoa käsitellessä tulee käyttää suojakäsineitä ja työtakkia. Valmis liuos kaadetaan autoklavoinnin kestävään säilytyspulloon ja autoklavoidaan ennen käyttöä. Autoklavoitu 1M Tris-HCl-liuos säilytetään huoneenlämmössä, jossa se säilyy käyttökelpoisena yhden vuoden.

1.5 M Urea/ 0.1xSSC -liuos

Valmistettaessa 2000 ml 1.5M urea/0.1xSSC liuosta, lasketaan punnittava urean määrä seuraavasti:

$$C=1.5 \text{ mol/l}, V=2 \text{ l}, M=60.06 \text{ g/mol}$$

$$m=1.5 \text{ mol/l} \times 2 \text{ l} \times 60.06 \text{ g/mol}=180.18\text{g}$$

Ureaa punnitaan 180.18 g analyysivaa'alla ja liuotetaan dekantterissa lähelle 2000 ml:aa milliQ vettä. Valmistettaessa 2000 ml 1.5M urea/0.1xSSC liuosta, lasketaan 20xSSC:n määrä seuraavasti: $2000\text{ml}/200=10 \text{ ml}$. Liuokseen pipetoidaan 10 ml 20xSSC:tä. Liuos täytetään 2000 ml:n merkkiin mittapullossa milliQ vedellä. Valmis liuos kaadetaan säilytyspulloon. 1.5M urea/0.1xSSC-liuos säilytetään jääkaappilämpötilassa (+2-8° C), jossa se säilyy käyttökelpoisena yhden vuoden.

LIITE 2. Plasmidi-DNA:n eristysohje

1. Kahdessa 50 ml falcon-putkessa oleva bakteerimassa sentrifugoitiin 3500 rpm:n nopeudella 40 minuutin ajan huoneenlämmössä, jonka jälkeen supernatantti poistettiin kaatamalla. Myöhemmin tarvittava ELU-puskuri laitettiin lämpenemään +65 °C:een vesihautteeseen.
2. Putkien pohjalle jääneet solut suspensoitiin 12 ml:aan RES-puskuria. RES-puskuri sisältää RNAaseja, joiden aktiivisena pitämiseksi pipetoimme puskurin +4 °C:een lämpöisenä.
3. Bakteeri+RES -liuokseen lisättiin LYS-puskuria solujen hajotusta varten ja puskurin annettiin vaikuttaa 5 minuutin ajan huoneenlämmössä.
4. LYS-puskurin vaikuttaessa asetettiin Column-erottelupylväät telineeseen ja erottelypylväiden sisään kuivat Filter-suodattimet. Alle laitettiin astia läpi valuvaa nestettä varten.
5. Pipetoimme 15 ml:aa EQU-puskuria suodattimen reunoja pitkin kiertävällä liikkeellä, jotta kuivat suodattimet kostuisivat ja läpäisisivät nestettä tasaisesti.
6. Lisäsimme bakteeri+LYS -puskuriseokseen 12 ml:aa NEU-puskuria, joka sisältää mm. kalium-asetaatia. Liuos sekoitettiin kääntelemällä putkea muutaman kerran ylösalaisin.
7. Plasmidien puhdistaminen aloitettiin kaatamalla falcon-putkien sisältö suoraan suodattimen sisältävään pylvääseen, mahdollisimman keskelle suodatinta (reunoja välttäen).
8. Pipetoimme jälleen 15 ml:aa EQU-puskuria suodattimen reunoille kiertävällä liikkeellä. Pylväästä tippuvaa nestettä ei tässä vaiheessa kerätty talteen.
9. Kun kaikki neste oli valunut pylväästä, otimme varovasti ja reunoja koskettamatta suodattimen pois pylväästä. Suodatin heitettiin pois.
10. Pesimme plasmidi-DNA:n sisältävää pylvästä pipetoiden noin 8 ml:aa WASH-puskuria pylvään sisään. Toistimme pesun useita kertoja.
11. Tässä vaiheessa nesteenkeruualustan tilalle vaihdettiin puhtaat falcon-putket. Lisäsimme

15 ml:aa esilämmitettyä ELU-puskuria pylväisiin. Plasmidi-DNA siirtyi eluoinnilla pylvästä falcon-putkeen.

12. Lisäsimme falcon-putkiin 10 ml:aa isopropanolia ja sentrifugoimme putkia noin 4000 rpm:n kierrosnopeudella 40 minuuttia +4 °C:ssä.

13. Isopropanoli-supernatantti kaadettiin pois ja pohjalle jääneen napin päälle lisättiin 5 ml:aa 70 %:sta etanolia. Etanoli-DNA-seosta sentrifugoitiin 4000 rpm:n kierrosnopeudella 15 minuuttia huoneenlämmössä.

14. Sentrifugoinnin jälkeen etanoli poistettiin näytteistä mahdollisimman hyvin, jotta näytteet kuivuisivat nopeasti. Jäljelle jääneen etanolin annettiin haihtua sakan päältä huoneenlämpöisessä vetokaapissa. Näytteiden kuivumiseen meni noin 30 minuuttia.

15. Kuivunut sakka suspensoitiin 200 µl:aan TE-puskuria ja näytteet siirrettiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin.

16. Näytteet säilöttiin -21 °C:een pakastimeen.